

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Der Einfluss von Galektin-1-Silencing durch mRNA-Interferenz auf die Synzytiumbildung der Trophoblasten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Andrea Thammer, geb. Tschakert

aus

München

Jahr

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Arthur Mayerhofer

Prof. Dr. Viktor Magdolen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Aurelia Vattai

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2018

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Wissenschaftliche Grundlagen	11
2.1 Die wichtigsten tierischen Lektine, deren Vorkommen und Funktionen	11
2.2 Die Familie der Galektine	15
2.3 Galektin-1	19
2.3.1 Struktur und Synthese	19
2.3.2 Bindungsspezifität	20
2.3.3 Funktion	21
2.4 Die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin	24
2.5 Syncytin	26
2.6 Die Physiologie der Frühschwangerschaft - Trophoblasten als Voraussetzung einer erfolgreichen Schwangerschaft	26
2.6.1 Implantation, Plazentation und die Rolle der Trophoblastzellen	26
2.7 Das Trophoblastzellmodell	28
3 Zielsetzung	29
4 Material	30
4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
4.2 Chemikalien	32
4.3 Lösungen	32
4.4 Medien	33
4.5 Antikörper	33
4.5.1 Immunzytochemie	33
4.5.2 Doppelimmunfluoreszenz	34
4.6 Farbstoffe Fluoreszenzfärbung	34
4.7 Zellkultur: Basiszelllinien und Kulturmedien	34
4.7.1 Zelllinien	35
4.8 Software	38
4.9 Reagenzien und Lösungen für explizite Versuche	38
4.9.1 Immunzytochemie	38
4.9.2 Doppelimmunfluoreszenz	38

4.9.3	RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Real-time RT-PCR.....	39
4.9.4	Bradford-Assay, ELISA	40
5	Methoden	41
5.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	41
5.1.1	Zellkultivierung	41
5.1.2	Auftauen und Einfrieren der Zellen	42
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl	43
5.2	Immunzytochemie.....	44
5.2.1	Prinzip	44
5.2.2	Durchführung	45
5.2.3	Auswertung	46
5.3	Doppelimmunfluoreszenz-Zytochemie.....	48
5.3.1	Prinzip	48
5.3.2	Durchführung	48
5.3.3	Auswertung	50
5.4	Fluoreszenzfärbung	51
5.4.1	Prinzip	51
5.4.2	Durchführung	51
5.4.3	Auswertung	52
5.5	Quantitative Real-time RT-PCR (TaqMan®-PCR)	52
5.5.1	Prinzip	53
5.5.2	Durchführung	53
5.5.3	Auswertung	57
5.6	ELISA.....	58
5.6.1	Vorbereitung des ELISAs mit dem Bradford-Assay	58
5.6.2	Durchführung	60
5.6.3	Auswertung	63
5.7	Statistische Auswertung.....	63
6	Ergebnisse	64
6.1	Galektin-1-Konzentration der gesilenceden BeWo-Zelllinien	64
6.2	Adhäsionsmoleküle.....	66
6.2.1	E-Cadherin.....	66
6.2.2	Nachweis von β -Catenin	70
6.3	Direkte Nachweise für Fusion	73
7	Diskussion.....	79

8	Zusammenfassung.....	85
9	Firmenverzeichnis	87
10	Danksagung	89
11	Veröffentlichungen/ Kongress-Teilnahmen	90
12	Lebenslauf.....	91
13	Literaturverzeichnis	92
14	Ehrenwörtliche Erklärung	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur, Quervernetzung und Funktion der Galektine 1-15 (Gabriel, et al., 2009):	17
Abbildung 2:	Kristallographisch dargestellte Struktur von humanem Galektin-1 (ProteinDataBank13).....	20
Abbildung 3:	Kristallographische Darstellung des E-Cadherin- β -Catenin-Komplex im Rahmen der Zelladhäsion (Xu, et al., 2007).	25
Abbildung 4:	Schematische Zeichnung der Implantation einer befruchteten Eizelle im Uterusepithel. (HumanEmbryology13).....	27
Abbildung 5:	Galektin-1-mRNA-Expression, der transient Galektin-1 gesilenceden BeWo-Zellen (Bewo-Gal1) und der zugehörigen Kontrollzellen (Bewo-Ctrl), 0 bis 72 Stunden nach Kultivierung; (© SIRION Biotech GmbH).....	36
Abbildung 6:	Galektin-1-mRNA-Expression, der stabil Galektin-1 gesilenceden BeWo-Zellen (sh Gal1-124) und der korrespondierenden Kontrollgruppe (Non Target Ctrl).	37
Abbildung 7:	Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von Galektin-1	64
Abbildung 8:	Auswertung der Zellfusion nach 72 Stunden Kultivierung im Rahmen der doppelimmunzytochemischen Färbung von Galektin-1.....	65
Abbildung 9:	Nachweis der Galektin-1-Konzentration mittels ELISA;.....	65
Abbildung 10:	Graphische Auswertung der Galektin-1-mRNA-Expression.	66
Abbildung 11:	Immunzytochemische Färbung von E-Cadherin.	67
Abbildung 12:	Auswertung des Fusionsverhaltens im Rahmen der immunzytochemischen Färbung von E-Cadherin.....	68
Abbildung 13:	Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von E-Cadherin.....	69
Abbildung 14:	Auswertung der E-Cadherin-PCR.	69
Abbildung 15:	Nachweis von β -Catenin mittels immunzytochemischer Färbung. ...	70
Abbildung 16:	Auswertung des Fusionsverhaltens im Rahmen der immunzytochemischen Färbung von β -Catenin.	71
Abbildung 17:	Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin.....	72
Abbildung 18:	Auswertung der β -Catenin-PCR.....	72
Abbildung 19:	Auswertung der β -Catenin-Protein-Expression mittels ELISA.....	73

Abbildung 20:	Analyse des Fusionsverhaltens mittels Farbstoffspektralversuch. ..	74
Abbildung 21:	Auswertung des Fusionsverhaltens mittels Farbstoffspektralversuch.	75
Abbildung 22:	Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von Syncytin;	76
Abbildung 23:	Auswertung der Syncytin-Konzentration mittels doppelimmunfluoreszenz-zytochemischen Färbungen.	77
Abbildung 24:	Auswertung der Konzentration des gelösten E-Cadherins (sE- Cadherin, soluble E-Cadherin) im Zellkulturüberstand von Galektin-1- gesilenceder Trophoblasttumorzellen und der Non-Target- gesilenceden Kontrollgruppe.....	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung verschiedener Säugetierlektine in Familien (Gabius, 2001)	13
Tabelle 2:	Funktionen von tierischen Lektinen, (Gabius, 2001) erweitert.....	15
Tabelle 3:	Expression von Galektin in Geweben des Säugetiers. Nach (Hughes, 1999) und (Gabius, et al., 2004), erweitert und modifiziert.	16
Tabelle 4:	Fetomaternale Kontaktflächen (Markert, et al., 2017)	28
Tabelle 5:	Übersicht der verwendeten Zelllinien	35
Tabelle 6:	Auswertungstabelle zur Beurteilung der immunzytochemischen Färbungen nach dem immunreaktiven Score (IRS).	47
Tabelle 7:	Überblick über Fluorochrome mit zugeordneten Filtern und Fluoreszenzsignal.	50
Tabelle 8:	Komponenten des 2xRT-Mastermixes	55
Tabelle 9:	Rezeptur des Mastermixes für die quantitative Real-time RT-PCR.	56
Tabelle 10:	Primer der qualitativen Real-time RT-PCR (TaqMan®-PCR).....	57
Tabelle 11:	ELISA-Kits der Firma R&D Systems	60

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BeWo	Zelllinie aus einem humanen Chorionkarzinom
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation (immunphänotypisches Oberflächenmerkmal von Zellen)
CRD	Kohlenhydraterkennende Domäne (Carbohydrate Recognition Domain)
dest.	destilliert
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat, Fluorochrom zur Färbung von Zellmembranen
DiO	1,1'-dioctadecylindocarbocyanine perchlorat, Fluorochrom zur Färbung von Zellmembranen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid (Gefrierschutz zur Kryokonservierung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FCS	Fötales Kälberserum
Gal 1	Galektin 1
HELLP	Hemolysis, Elevated Liver function test, Low Platelet counts
Ig	Immunglobulin
IRS	ImmunoReaktiver Score
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung (IntraUterine Growth Restriction)
min.	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger RibonukleinAcid)
OD	Optische Dichte (Maßeinheit ELISA)
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Präeklampsie

Abkürzung	Bedeutung
SEM	Standard Error of the Mean (Standardabweichung)
Std.	Stunde
Upm	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

„Gott muss Galektine lieben: er hat so viele von ihnen gemacht.“ lautet der Titel einer Publikation von Cooper und Barondes aus dem Jahre 1999 (Cooper, et al., 1999). Der Titel bezieht sich auf ein Zitat des 16. Präsidenten der Vereinigten Staaten von Amerika, Abraham Lincoln. Von ihm stammt der berühmte Satz: „Gott hat die einfachen Menschen offenbar geliebt, denn er hat so viele von ihnen gemacht.“. Dieser beherzte Titel von Coopers und Barondes trug den vielen Erkenntnissen von 25 Jahren wissenschaftlicher Arbeit Rechnung. Denn erst im Jahre 1975 wurde Galektin-1, als erstes von inzwischen 15 bekannten Galektinen, ursprünglich unter dem Namen Elektrolektin erstmals entdeckt (Teichberg, et al., 1975). Bei Galektin-1 handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das auf der Außenseite von Plasmamembranen lokalisiert ist.

Dieses Protein fasziniert, da es im gesamten Organismus von Säugetieren in unterschiedlichen Organsystemen vorkommt und dort vielfältige, zum Teil gegenläufige Funktionen hat. So kann Galektin-1 das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen stimulieren. In anderen Geweben leitet es die Apoptose ein.

In den letzten Jahren wird immer mehr die essentielle Rolle von Galektin-1 im Rahmen der Schwangerschaft verstanden. Eine erfolgreiche Schwangerschaft wird von der Funktion und der Interaktion von Trophoblastzellen und maternalen uterinen Immunzellen bestimmt (Trundley, et al., 2004), (Markert, et al., 2017). Ohne sie könnte sich die befruchtete Eizelle nicht weiterentwickeln. Das Synzytium als Zellverband von Trophoblastzellen ist essentiell für die Implantation und die Plazentation (siehe Kapitel 2.5). Bei einer gestörten Synzytiumbildung kommt es zu verschiedenen Schwangerschaftspathologien, bis hin zum Abort. (Schneider, et al., 2006). Bei der Implantation einer Schwangerschaft handelt es sich um einen inflammatorischen Prozess. Eine zentrale Rolle in der Immunregulation spielen dabei Leukozyten und Galektine (Jeschke, et al., 2013). Kommt es zu einem Ungleichgewicht der immunologischen Zellen im Endometrium, beispielsweise zur höheren Expression von uterinen natürlichen Killerzellen wird die Implantation, sowie die Plazentation negativ beeinflusst (Tuckerman, et al., 2010).

Aus vorhergehenden Studien ist eine stimulierende Wirkung von Galektin-1 auf die Synzytiumbildung bekannt (Fischer, et al., 2011), (Kolundzic, et al., 2011). In den letzten Jahren wurde in Studien erstmals ein Zusammenhang zwischen niedrigen Galektin-1-Konzentrationen und Aborten unklarer Genese festgestellt (Jeschke, et al., 2010), (Ramhorst, et al., 2012), (Wu, et al., 2015).

Hat ein Galektin-1-Mangel Einfluss auf die Synzytiumbildung, den elementaren Prozess jeder Schwangerschaft? Wie beeinflusst dieses Oberflächenprotein die unmittelbare Zellfusion, vermittelt unter anderem durch die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin? Diese Fragestellung wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Grundlage dieser Arbeit ist ein etabliertes Trophoblast-Zellmodell, bestehend aus der Trophoblasttumorzelllinie BeWo. Die Zellen dieser Zelllinie wurden ursprünglich aus einem Chorionkarzinom isoliert. Um den Einfluss von fehlendem Galektin-1 auf die Synzytiumbildung zu untersuchen, wurde das Zellmodell angepasst, indem die Trophoblasttumorzellen für diese Arbeit durch das Verfahren *Silencing* genetisch verändert wurden. Bei der im Fokus stehenden Zelllinie wurde auf dem Genom die Sequenz für Galektin-1 blockiert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die ebenfalls diesem Prozess unterzogen wurden, allerdings an einer nicht kodierenden Region des Genoms. Diesen Vorgang bezeichnet man in der Wissenschaft mit dem englischen Wort „Silencing“ (Clark, et al., 2009), (Bopp, et al., 2012). Im Deutschen wird das Wort „Silencing“ ebenfalls gebraucht. Daher werden die Zellen in dieser Arbeit mit dem assimilierten Anglizismus „gesilencede“ Zellen bezeichnet.

2 Wissenschaftliche Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über das Vorkommen und die Funktionen von Lektinen und Galektinen. Das besondere Augenmerk richtet sich dabei auf das im Fokus stehende Galektin-1 und auf die für die Fusion essentiellen Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin. Des Weiteren wird die Physiologie nativer Trophoblastzellen und das hier angewandte Trophoblastzellmodell dargestellt.

2.1 Die wichtigsten tierischen Lektine, deren Vorkommen und Funktionen

Das komplexe System des menschlichen Organismus bestimmen Zellinteraktionen und Stoffwechselprozesse. Entscheidend dabei sind biochemische Signalwege. Seit den 1990er Jahren rücken dabei vor allem die Kohlenhydrate immer mehr in das Zentrum des Interesses (Varki, 1993) (Lis, et al., 1993) (Sharon, et al., 2004) (Cook, 1995). Kohlenhydrate fungieren bei vielen biochemischen Prozessen als Signalmoleküle. Sie dienen bei unterschiedlichen Erkennungsprozessen im Organismus in kovalent gebundener Form als Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane. Die Kohlenhydratketten haben unter anderem große Bedeutung bei Zell-Zell-Interaktionen, der Bindung von Zellen an andere Strukturen, Antigen-Antikörper-Reaktionen, Hormonwirkungen und rezeptorvermittelte Endozytose (Koletzko, 2004). Kohlenhydrate können ihrer Funktion als Signalmolekül erst nachkommen, wenn sie auf die passenden Rezeptoren treffen, die wiederum für das Umsetzen in weitere biologische Effekte verantwortlich sind. Diese Rezeptormoleküle können in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: In Enzyme, Antikörper und Kohlenhydrat-bindende Proteine. Diese Kohlenhydrat-bindenden Proteine bezeichnet man als Lektine (Barondes, 1988).

Im Jahr 1980 definierten Goldenstein et al. Lektine neu: Demnach handelt es sich bei Lektinen um spezifische, ursprünglich nur in Pflanzen detektierte, Kohlenhydrat-bindende Proteine nicht immunogener Herkunft. Sie besitzen die Fähigkeit, Zellen zu agglutinieren und Polysaccharide bzw. Glykokonjugate zu präzipitieren (Goldenstein, et al., 1980). Die ersten Lektine wurden aus Pflanzen isoliert und trugen aufgrund ihrer Eigenschaft, Blutzellen zu agglutinieren, den Namen Phytohämagglutinine (Linnemann, et al., 2003). Heute weiß man, dass sie ubiquitär in der Natur verbreitet

sind. Man findet sie in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (Tabelle 2) (Gupta, 2012).

Ihren Namen verdanken Lektine ihrer Fähigkeit, bestimmte Zuckerstrukturen spezifisch zu binden, und somit nur bestimmte Zellen zu agglutinieren. Die Bezeichnung Lektin leitet sich von dem lateinischen Wort „legere“ (auswählen) ab und etablierte sich mit der Entdeckung der Blutgruppen (Boyd, et al., 1954).

Durch ihre Fähigkeit, sich reversibel an spezifische Kohlenhydratstrukturen zu binden, sind Lektine, auch als Glykoproteine bezeichnet, in der Lage, sich gezielt an Zellmembranen zu binden und dadurch biochemische Reaktionen auszulösen – sie selbst besitzen jedoch keine enzymatische Aktivität (Horn, 2012). Lektine dienen unter anderem zur Markierung und Agglutination von Zellen, stehen aber nicht in verwandtschaftlicher Beziehung zu Antikörpern oder Immunglobulinen. Die Fähigkeit, Liganden aus Zuckerstrukturen im Extrazellularraum spezifisch zu binden, ist für viele Entwicklungsprozesse und die Zell-Zell-Erkennung entscheidend. Die Lymphozytenwanderung stellt ein physiologisches Beispiel dar: Selectine sind mitunter für die Zell-Zell-Adhäsion während dieses Prozesses verantwortlich. Aber auch pharmazeutisch sind Lektine von Interesse: Durch Glykosilierung können die antigenen Eigenschaften dieser Glykoproteine modifiziert werden (Alberts, et al., 5. Auflage, 2011).

Die mehr als 100 bekannten Lektinen können in fünf Gruppen unterteilt werden, basierend auf ihrer unterschiedlichen Affinität zu den Monosacchariden in Mannose, Galaktose/ N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglukosamin, Fucose und N-Acetylneuraminsäure (Lis, et al., 1998).

Tierische Lektine weisen sogenannte „carbohydrate recognition domains“ (CRDs), einen kohlenhydratbindenden Bereich auf und können aufgrund unterschiedlicher Sequenzen und Topologie dieses Strukturmotivs zusätzlich eingeteilt werden wie in Tabelle 1 (Drickamer, 1995):

Familie	Struktur	Zuckerligand	Beispiele
C-Typ	Konservierte CRD mit Ca ²⁺ -Ionen	variabel (u. a. Mannose, Galaktose, Fucose, Heparintetrasaccharid)	Selektine Kollektine
I-Typ	Immunglobulin-ähnliche CRD	variabel (Man ₆ GlcNAc ₂ , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, α2,3-/ α2,6-Sialyllaktose)	Siglecs
Galektine (früher S-Typ)	Konservierte CRD	Galβ1,3(4)GlcNAc, Basisstrukturen mit Spezies- und Galektintypabhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung z. B. zu den Blutgruppenepitopen A, B oder H; Affinität auch zu Poly-(N-Acetyl-Laktosamin)-Ketten	Galektin 1-14
Pentraxine	Pentamerische Anordnung der Untereinheiten	4,6-Ringazetale von β-Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide	Serum-Amyloid A (SAA), C-reaktives Protein (CRP)
P-Typ	Konservierte CRD	Mannose-6-Phosphat enthaltende Glykoproteine	CD-MPR IGF-II/ MPR

Tabelle 1: Einteilung verschiedener Säugetierlektine in Familien (Gabius, 2001)

Die Bindung von Lektinen an Oligosaccharide kann unterschiedliche biologische Folgen haben: Lektine können Rezeptoren stimulieren oder blockieren. Zellen können durch Virus- oder Bakterienlektine infiziert und durch toxische Lektine, wie das Ricinustoxin, abgetötet werden (Uhlenbruck, 1991; Vol. 68, Issue 12, pp 606-612). Einen Überblick über die vielseitigen Funktionen von Lektinen vermittelt Tabelle 2:

Aktivität	Beispiele für zugehörige Zuckerliganden
Erkennen von Stammregionen von N-Glykanen, ein Signal für die Konjugation von Ubiquitin, wenn es in inkorrekt gefalteten Proteinen zugänglich ist	F-Box Proteine Fb1/ 2 (Fbx2/ FBG1, Fbx6b/ FbG2) als Liganden-spezifische Teile des SCF Ubiquitin-Ligase-Komplexes
Liganden-selektive molekulare Chaperone im Endoplasmatischem Retikulum	Calnexin, Calretikulin
Leitung von falsch gefalteten Glykoproteinen zu dem mit dem Endoplasmatischen Retikulum verbundenen Abbau	EDEM/ Mn11 (Htm1)

Aktivität	Beispiele für zugehörige Zuckerliganden
Intrazelluläre Wegweiser („routing“) von Glykoproteinen und Vesikeln	ERGIC-53, VIP-36 (wahrscheinlich auch ERGL und VIPL), P-Typ Lektine, Komitin
Intrazellulärer Transport und extrazellulärer Zusammenbau	nicht-Integrin 67 kDa Elastin/ Laminin-bindendes Protein
Induziert Superimposition und „zippering“ von Membranen (Bildung von Birbeck Granulas)	Langerin (CD 207)
Zelltyp spezifische Endozytose	Asiaglykoproteinrezeptoren der Leber und von Makrophagen, dendritische Zellen und Makrophagen (C-Typ), Lektine (Mannose-Rezeptor), P-Typ-Lektine
Erkennen von fremden Zuckern (β 1,3-Zucker, LPS)	CR3 (CD11b/ CD18), Limulus-Koagulationsfaktoren C und G, Dektin-1
Erkennen von fremden oder abweichenden Zuckersignaturen auf Zellen (inklusive von Endozytose, Einleitung der Opsonierung oder Komplementaktivierung)	Kollektine, L-Ficolin, C-Typ Rezeptor von Makrophagen und dendritischen Zellen, Pentraxine (CRP, Limulin)
Zielausrichtung der Enzymaktivität in multimodularen Proteinen	Akrosin, Limulus-Koagulationsfactor C
Brückenbildung zwischen Molekülen	Homodimer und Tandem-repeat Galektine, Cytokine (z.B. IL-2, IL-2R und CD3 von TCR), cerebellar-lösliches Lektin
Induktion oder Suppression von Effektorenfreisetzung (H_2O_2 Cytokine u. a.)	Galektine, Selektine und andere C-Typ-Lektine wie CD23, BDCA-2 und Dektin-1
Kontrolle des Zellwachstums und Induktion von Apoptose/ Anoikis	Galektine, C-Typ-Lektine, Amphoterin-like Protein, Hyaluronsäure-bindendes Protein, cerebellar-lösliches Protein
Zellwanderung und Routing	Selektine und andere C-Typ Lektine, Galektine, I-Typ Lektine, Hyaluronsäure-bindende Proteine (RHAMM, CD44, Hyalektane/ Lektikane)
Zell-Zell-Interaktionen	Selektine und andere C-Typ Lektine (z. B. DC-SIGN), Galektine, I-Typ Lektine (z. B. Siglecs, N-CAM, P ₀ oder L1)
Zell-Matrix-Interaktionen	Galektine, Heparin- und Hyaluronsäure-bindende Lektine, einschließlich der Hyalektane/ Lektikane, Calretikulin
Zusammenbau des Matrixnetzwerkes	Proteoglykan-Kernproteine (C-Typ CRD und G1 Domäne von Hyalektanen/ Lektikanen),

Aktivität	Beispiele für zugehörige Zuckerliganden
	Galektine (z.B. Galektin-3/ Hensin), nicht-Integrin 67 kDa Elastin/ Laminin-bindendes Protein

Tabelle 2: Funktionen von tierischen Lektinen, (Gabiuss, 2001) erweitert

In Tabelle 2 ist ersichtlich, dass eine Untergruppe der Lektine, die Galektine, an einer großen Zahl von biologischen Prozessen beteiligt ist. Da Galektin-1 im Fokus dieser Arbeit steht, wird im folgenden Kapitel die Familie der Galektine beleuchtet.

2.2 Die Familie der Galektine

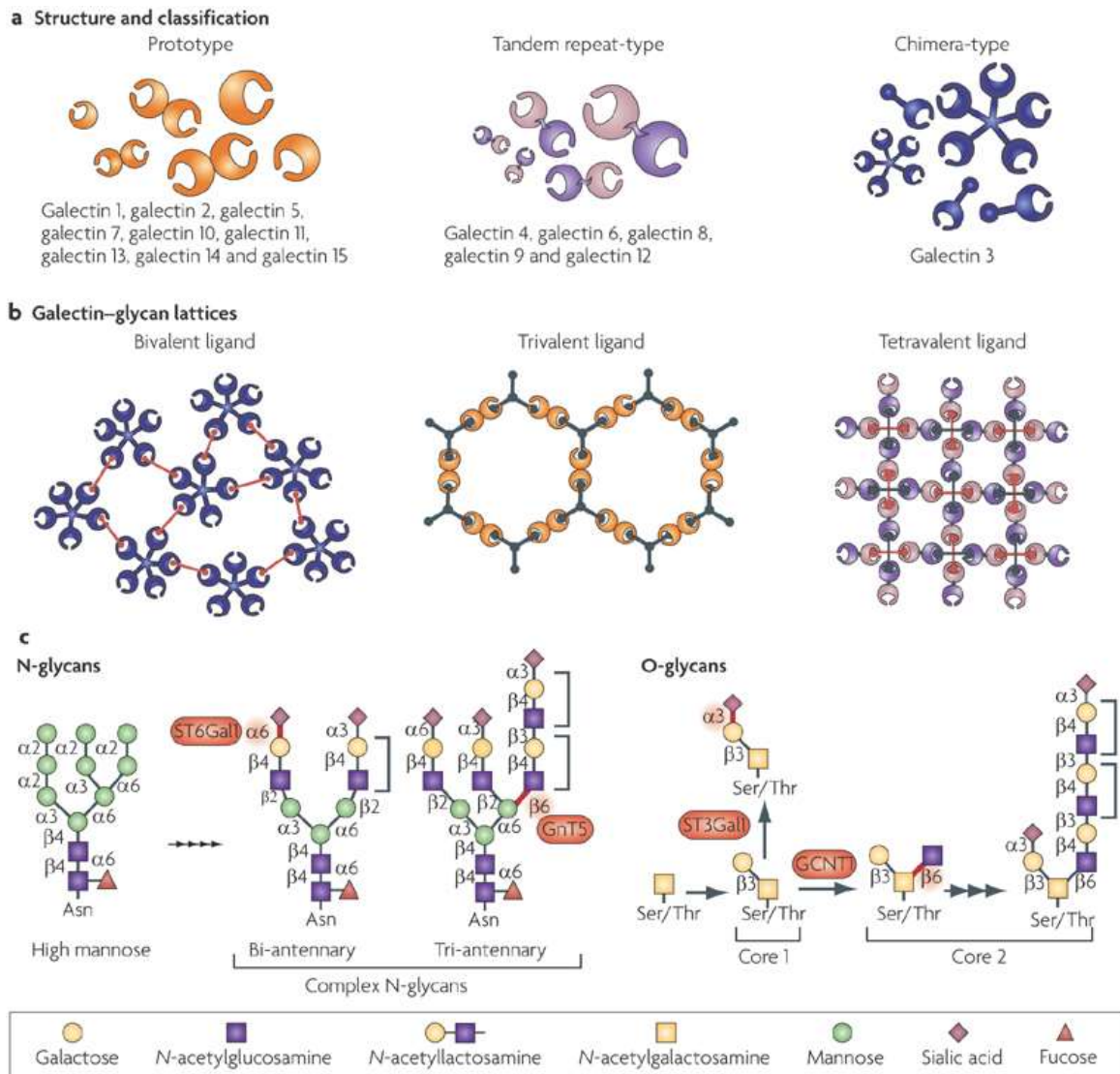
Eine entscheidende Arbeit von Barondes et al. führte im Jahre 1994 die Bezeichnung „Galektin“ ein und gab dieser Proteinfamilie einen einheitlichen Namen (Barondes, et al., 1994). Unter dem Begriff „Galektin“ fasste Barondes et al. Glykoproteine mit charakteristischen Merkmalen zusammen. Die spezifische Bindungsaffinität der Galektine für β -Galaktoside und die signifikante Ähnlichkeit der kohlenhydrat-bindenden Domäne (CRD) ist definierend (Barondes, et al., 1994). Diese besonderen Glykoproteine, die calciumunabhängig agieren und das Strukturmerkmal eines „sandwich“-Faltungsmusters für antiparallele β -Faltblätter aufweisen, werden an Ribosomen, die an das zytoplasmatische Retikulum gebunden sind, synthetisiert (Hsu, et al., 2004). Diese Proteine sind weit verbreitet und kommen sowohl im menschlichen und tierischen Organismus, als auch in Pilzen vor. Galektine besitzen hochkonservierte Aminosäuresequenzen, die bis auf das Zeitalter des Präkambriums zurückgeführt werden können (Ksai, et al., 1996). Über ihr Vorkommen im Organismus von Säugetieren gibt die Tabelle 3 Aufschluss.

Seit den 1970er Jahren stehen Galektine im Interesse der Wissenschaft. Damals wurde von Teichberg et al. als erstes das heutige Galektin-1 unter dem Namen „Elektrolektin“ entdeckt (Teichberg, et al., 1975). Bis heute sind 15 Galektine bekannt. Im Jahre 2004 wurde das neueste Galektin, Galektin-15, entdeckt (Gray, et al., 2004), (Gray, et al., 2005). Die Benennung bzw. Nummerierung der Galektine basiert auf ihrer Entdeckungsreihenfolge.

Galektin	Vorkommen
1	Skelett- und glatte Muskulatur, Motor- und Sensorneuronen, Niere, Plazenta, Thymus
2	Hepatozelluläres Karzinom, Gastrointestinaltrakt (v.a. Ileum)
3	Aktivierte Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile, Mastzellen, Epithelzellen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes
4	Mundschleimhaut, Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Lunge, Hoden, Plazenta in der RT-PCR
5	Retikulozyten, Erythrozyten (Ratte)
6	Intestinales Epithel
7	Keratinocyten, verhornte Epithelien, Karzinomzellen
8	Lunge, Leber, Niere, Herz, Gehirn, einige Tumorzelllinien
9	Leber, Dünndarm, Niere, Thymus (Maus/ Ratte); Lymphgewebe, B- und T-Zellen und Makrophagen, Pankreas
10	Charcot-Leyden Kristall-Protein (Hauptbestandteil von eosinophilen und basophilen Granulozyten)
11	Magen-Darm-Trakt des Schafes, durch Nematoden infektion induziert
12	Leukozyten, Adipozyten
13	Plazenta, Milz, Niere, Blase, Tumorzellen
14	Eosinophile Granulozyten des Schafes, die in das bronchoalveoläre Sekret sezerniert werden
15	Uterus des Schafes und der Ziege

Tabelle 3: Expression von Galektin in Geweben des Säugetiers. Nach (Hughes, 1999) und (Gabijs, et al., 2004), erweitert und modifiziert.

Eine der zwei definierenden Kennzeichen der Galektine ist die kohlenhydratbindende Domäne (CRD, *carbohydrate recognition domain*). Aufgrund dieser unterschiedlichen Topologie ihrer Kohlenhydratbindungssequenz sind sie strukturell in drei Gruppen einzuteilen (Abb. 1a): Die Prototypen liegen als Monomer oder als nicht-kovalentes Dimer einer CRD vor, bei Tandem-Repeat-Typen handelt es sich um Galektine mit zwei verschiedenen CRDs, die über ein kurzes Peptid verknüpft sind. Der Chimera-Typ definiert sich durch eine CRD und eine Nicht-Lektin-Domäne (Hirabayashi, et al., 1993).



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1: Struktur, Quervernetzung und Funktion der Galektine 1-15 (Gabriel, et al., 2009):

- Einteilung der Galektine nach der Topologie ihrer CRD (Proto-, Chimera- und Tandem-Repeat-Typ). Sie können als Mono-, Di- oder Oligodimer vorliegen.
- Galektine formieren sich zu Netzwerken, miteinander verbunden über Kohlenhydratbindungen.
- Varianz der Signaltransduktionswege von Galektinen durch Bindung oder Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren.

Nicht zuletzt aufgrund ihres intra- und extrazellulären Vorkommens haben Galektine ganz unterschiedliche Funktionen. Sie können sich im Extrazellularraum nicht nur an die Oberflächenrezeptoren einer Zelle binden, sondern auch Dimere oder Oligodimere bilden, indem sie die gebundenen Oberflächenrezeptoren quervernetzen (Abbildung 1b). Durch diese Eigenschaft sind Galektine in der Lage, viele unterschiedliche Signaltransduktionswege zu aktivieren (Liu, et al., 2005), (Rabinovich, et al., 2002).

Der intrazelluläre Wirkmechanismus unterscheidet sich vom extrazellulären; er kann zum Teil komplett gegenläufig sein: Während außerhalb der Zelle die Kohlenhydratbindung im Vordergrund steht, scheint intrazellulär die Protein-Protein-Interaktion grundlegend zu sein (Liu, et al., 2005). Ein Beispiel für die gegensätzliche Wirkung, abhängig vom Wirkungsort konnte die Arbeitsgruppe um Fukumori et al. zeigen: Galektin-3 inhibiert die Apoptose im Extrazellularraum, aber induziert diese intrazellulär (Fukumori, et al., 2003).

Einige herausgegriffene Beispiele veranschaulichen das ubiquitäre Vorkommen und die Diversität von Galektinen:

Galektin-7 induziert über das Tumorsuppressorgen p53 die Apoptose in vielen Zellarten. Es wirkt Tumoren im Darm entgegen (Ueda, et al., 2004). Allerdings wurde eine Korrelation der vermehrten Expression von Galektin-7 bei aggressiven Subtypen von Lymphomen und Brustkrebs festgestellt (Demers, et al., 2010), (Demers, et al., 2007), (Demers, et al., 2005).

Galektine zeichnen sich immer mehr als signifikante Regulatoren der Immunzell-Homöostase ab. Ein Forschungsziel besteht darin, Galektine zukünftig als antiinflammatorische Mediatoren und selektive Modulatoren der Immunantwort einzusetzen (Rabinovich, et al., 2002). Ein Beispiel für die immunregulative Wirkung stellt Galektin-3 dar. Es kann sowohl die Apoptose von T-Zellen induzieren oder inhibieren und dadurch auch auf die Tumorentstehung Einfluss nehmen (Nakahara, et al., 2005). Liu et al. zeigten 2005 in einem Review, dass Galektine bei der Modulation von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Tumoren einen Einfluss haben. Demnach wird Galektin-3 im Gastrointestinal-Trakt eine protektive Wirkung zugeschrieben. In Studien konnte eine verringerte Expression von Galektin-3 im Rahmen von akuten oder chronischen Entzündungen im Darm nachgewiesen werden (Tsai, et al., 2015), (Brazowski, et al., 2009). In einem gastrointestinalen Inflammationsmodell an Mäusen mit chronischer Colitis wurde Galektin-3 therapeutisch verabreicht. Die Untersuchungsgruppe wies, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor, Interleukin-6 und Interleukin-1 β auf (Lippert, et al., 2008).

Ein weiteres Beispiel der immunologischen Funktion stellt Galektin-1 im Rahmen der Schwangerschaft dar. Unter anderem die Arbeitsgruppe von Blois konnte in einigen Studien belegen, dass Galektin-1 einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der fetomaternalen Toleranz zu Beginn der Schwangerschaft hat. Die detaillierten Studienergebnisse zeigt der folgende Abschnitt.

2.3 Galektin-1

Das initial entdeckte Oberflächenprotein Galektin wird in vielen Geweben exprimiert und hat unterschiedliche, zum Teil gegenläufige Funktionen, wie dieser Abschnitt zeigt.

2.3.1 Struktur und Synthese

Kodiert ist Galektin-1 durch das LSGALS-1-Gen (*lectin, galactoside binding, soluble I*), das auf dem Chromosom 22q12 lokalisiert ist. Die Synthese von Galektin-1 erfolgt an freien zytosolischen Ribosomen (Wilson, Firth et al., 1989), (Leffler, et al., 2004). Es handelt sich um einen atypischen Sekretionsweg. Bei der typischen Sezernierung werden Proteine zum Ende der Synthese in Vesikeln durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat transportiert und dort sezerniert. Dabei werden die Proteine posttranslational modifiziert. Bei Galektin-1 wird durch die atypische Sezernierung eine vorzeitige Bindung an Glykoproteine oder -lipide verhindert (Hughes, 1999), (Hsu, et al., 2004), (Moremen, 2002). Diese unkonventionelle Proteinsekretion lässt sich anhand einiger Eigenschaften nachweisen: So findet sich am Galektin-1 ein blockierter N-Terminus, es fehlen die Glykosylierung sowie Disulfidbindungen (Kasai, et al., 1996).

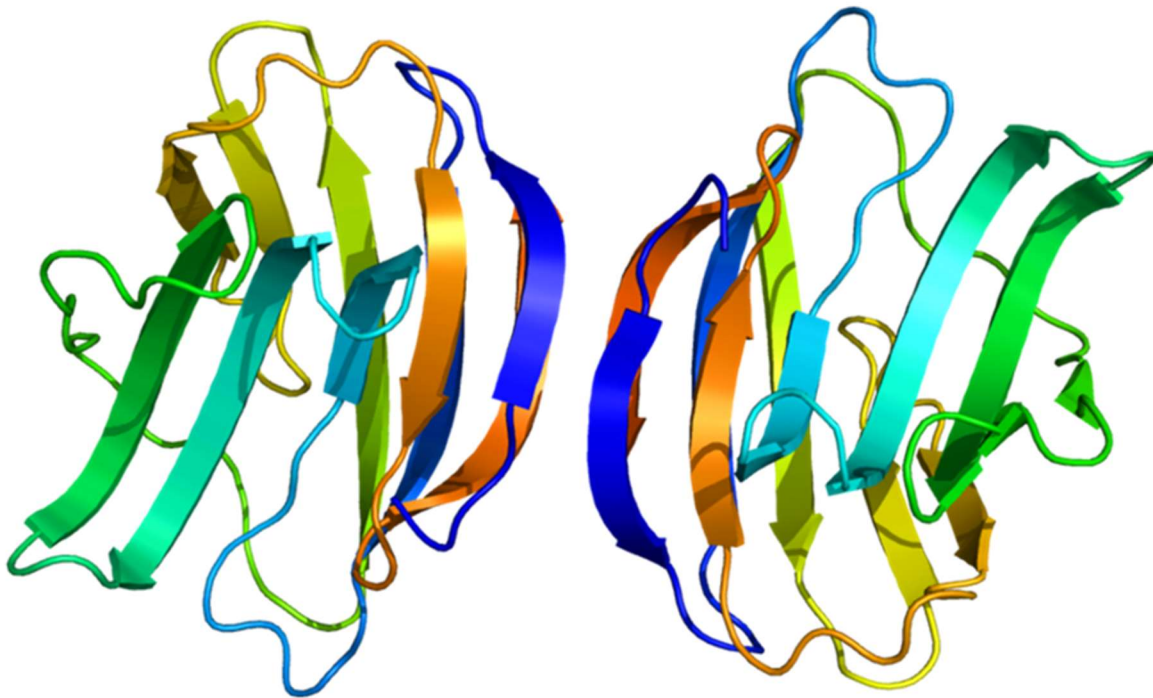


Abbildung 2: Kristallographisch dargestellte Struktur von humanem Galektin-1 (ProteinDataBank13).

Galektin-1 weist eine β -Sandwich-Struktur auf, dreidimensional veranschaulicht in Abbildung 2. Diese räumliche Struktur bildet sich aus zwei antiparallelen β -Faltblättern. In der Regel liegt Galektin-1 als Homodimer vor. Dabei sind zwei Monomere nicht kovalent aneinander gebunden. Nur in niedrigen Konzentrationen dissoziiert das Homodimer wieder in zwei einzelne Monomere (Cho, et al., 1995).

Seinen Wirkungsort an der Außenseite der Plasmamembran erreicht Galektin-1 durch seine β -Galaktosid-spezifische CRD auf unkonventionelle Weise. Das Protein wird durch die Bindung an Glykokonjugate, die als Cargorezeptoren fungieren, exportiert (Seelenmeyer, et al., 2005)

2.3.2 Bindungsspezifität

Die kohlenhydratbindenden Domänen (CRD) sind nicht nur für den Proteinexport an die Oberfläche der Zelle verantwortlich, sondern auch für die spezifische Bindungsaffinität zu Kohlenhydraten mit der Disaccharid-N-Acetyllactosamin-Sequenz Gal β 1-4GlcNAc/II. Jedes Galektin-1-Molekül besitzt zwei gleiche CRDs, da es strukturell zu den Prototypen zählt.

2.3.3 Funktion

Das Oberflächenprotein wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, beispielsweise in Skelett- und glatter Muskulatur, Motor- und Sensorneuronen, Niere und Darm.

Galektin-1 beeinflusst viele physiologische Abläufe im Organismus: die Differenzierung, Proliferation, Migration, Adhäsion, Transformation, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und das Wachstum von Zellen (Camby, et al., 2006).

Galektin-1 hat sowohl proliferative, als auch inhibierende und sogar Apoptose induzierende Funktionen. Beispiele für die proliferative Wirkung von Galektin-1 sind Lymphozyten (Symons, et al., 2000), Kupffersche-Sternzellen der Leber (Maeda, et al., 2004) sowie neuronale Stammzellen (Sakaguchi, et al., 2006) und Mammagefäßzellen (Moiseeva, et al., 2000). In Neuroblastomzellen (Kopitz, et al., 2001) und Chondrozyten (Marsich, et al., 2008) wird das Zellwachstum hingegen inhibiert.

Es zeichnet sich immer mehr ab, dass Galektin-1 bei immunologischen T-Zell-vermittelten Prozessen, d.h. bei akuten und chronischen Entzündungen, (Lui, 2005), (Lui, 2010) (Rabinovich, et al., 2002) (Deák, et al., 2015) sowie Allergien eine wichtige Rolle spielt (Mello, et al., 2015), (Sanchez-Cuellar, et al., 2012). Folglich wird Galektin-1 auch in immunprivilegierten Geweben, wie dem zentralen Nervensystem (Kuchler, et al., 1989), der Plazenta (Poirier, et al., 1992), dem Hodengewebe (Dettin, et al., 2003) und dem humanen Uterus (von Wolff, et al., 2005) exprimiert.

Fetomaternale Immuntoleranz

Die erfolgreiche Implantation einer Schwangerschaft verlangt eine immunologische und endokrinologische Adaptation des mütterlichen Organismus gegenüber dem Fetus. Die Plazenta zählt zu den immunprivilegierten Organen, da sie eine immunologische Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fetus herstellt (Ohshima, et al., 2001). Eine Barriere zwischen Zellen des maternalen Immunsystems und fetalen Antigenen bilden die differenzierten Trophoblastzellen (Beer, et al., 1986). Heute weiß man durch Untersuchungen an Mäusen, dass eine Selektion der Immunzellen vor der mütterlich/fetalen Grenzschicht stattfindet (Rink, et al., 2015). Die diversen Immunzellen haben dort unterschiedliche Funktionen. Uterine natürliche Killerzellen

und Makrophagen regulieren die Trophoblastzellinvasion und Umformung von Spiralarterien, T-Zellen und dendritische Zellen sind für eine adäquate Immuntoleranzentwicklung und die Immunantwort bei uterinen Infektionen verantwortlich (Gardner, et al., 2003), (Bulmer, et al., 2010), (Markert, et al., 2017). Progesteron wirkt immunsuppressiv, indem es Einfluss auf die T-Zellen nimmt. Es fördert die Interleukin-4-Sekretion und die CD30-Expression (Friese, et al., 2000).

Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Galektin-1-Mangel eine höhere Abortrate aufweisen als Mäuse mit einer natürlichen Konzentration an Galektin-1. Nach einer Galektin-1-Substitution der Mäuse mit Galektin-1-Mangel ist die Abortrate wieder deutlich gesunken (Blois, et al., 2007). Die Expression von Galektin-1 scheint für die Implantation der Schwangerschaft essentiell zu sein. Es wurde bei menschlichen Embryonen bereits an Tag drei und fünf nach Befruchtung die Galektin-1-Expression in das Trophoektoderm nachgewiesen. (Tirado-González, et al., 2013). Aktuelle Studien geben Hinweise, dass auch bei Menschen ein Mangel an Galektin-1 Ursache für Aborte sein könnte: Bei Frauen mit wiederholten Aborten unklarer Genese wurde eine erniedrigte Konzentration von Galektin-1 im Blut und Endometrium festgestellt (Jeschke, et al., 2010), (Ramhorst, et al., 2012), (Wu, et al., 2015). Dies verdeutlicht auch die wichtige Rolle des Oberflächenproteins in der Reproduktionsmedizin.

Eine hohe Konzentration von Galektin-1 im Trophoektoderm scheint ein protektiver Faktor für eine Schwangerschaft zu sein. Im ersten Trimester der Schwangerschaft ließen sich steigende Galektin-1-Konzentrationen nachweisen, nach dem erreichten Maximum im zweiten Trimester, fällt die Konzentration dann wieder ab (Tirado-González, et al., 2013).

Die Erkenntnis, dass eine ausreichende Galektin-1-Konzentration ein protektiver Faktor vor Aborten im ersten Trimenon zu sein scheint, ist entscheidend für die Forderung, dass eine Bestimmung von Galektin-1, neben der Bestimmung von freiem β -HCG und einer Ultraschalluntersuchung zum Ersttrimesterscreening, für eine Risikoabschätzung der Schwangerschaft eingeführt werden sollte (Reis, et al., 2002).

Die Galektin-1-Expression des Endometriums verändert sich während des weiblichen Zyklus und während der Schwangerschaft, beeinflusst durch Steroidhormone (Choe,

et al., 1997). Vor allem das Zusammenspiel von Progesteron und Galektin-1 ist zu Beginn einer Schwangerschaft wichtig: Nach einem Anstieg der Progesteronkonzentration, ist ein Anstieg der Galektin-1-Expression zu verzeichnen (Abbildung 3).

In einer Untersuchung konnte am Zellmodell mit HTR-8/SVneo Trophoblastzellen nachgewiesen werden, dass Progesteron die Sekretion von Galektin-1 stimuliert (Graham, et al., 1993). Umgekehrt zeigte sich jedoch bei einer Studie, in der Trophoblasttumorzellen BeWo mit rekombinantem Galektin-1 stimuliert wurden, eine geringere Progesteronausschüttung. Die Sekretionsrate von Progesteron war dabei dosisabhängig und scheint an das Thomson-Friedenreich-Antigen gekoppelt zu sein (Jeschke, et al., 2004). Diese interagierenden Prozesse bedingen die lokale Sezernierung von Galektin-1 in der Plazenta.

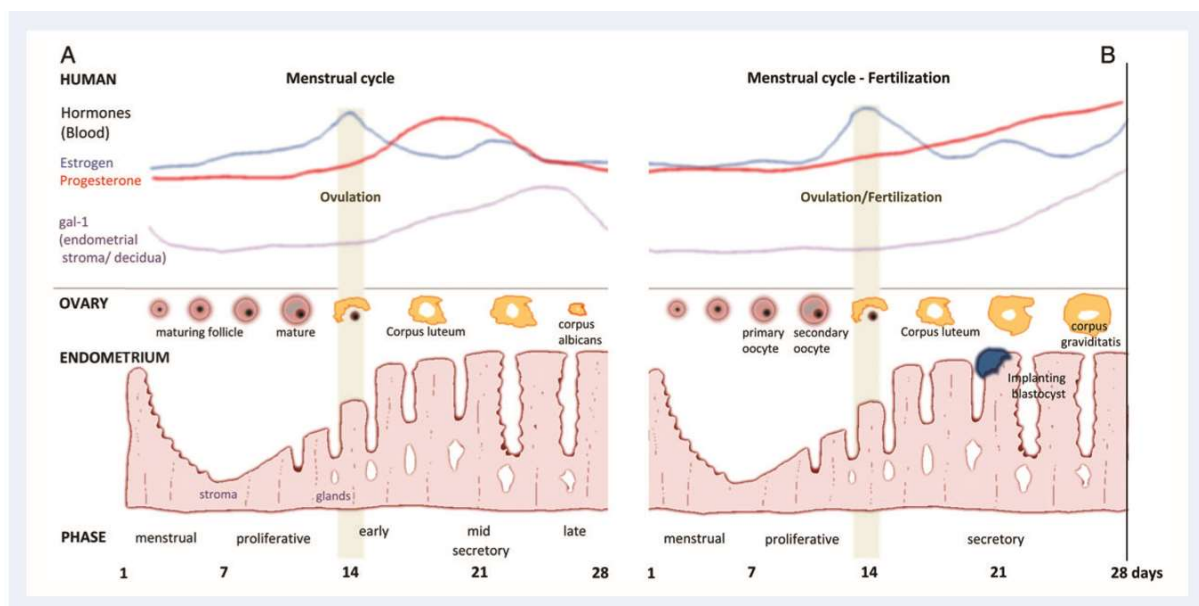


Abbildung 3: Dynamische Veränderungen der Galektin-1-Expression im Verlauf des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft. (Barrientos, et al., 2014)

Im humanen Endometrium ist die Galektin-1-Expression in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus hochreguliert, mit Anstieg der Progesteron-Konzentration (A). Die Galektin-1-Expression scheint zu diesem Zeitpunkt wichtig für die Transformation der Stromazellen des Endometriums (Dezidualisierung) zu sein. Dies ist die Grundlage für eine Implantation (B). Kommt es zum Einnisten einer Blastocyste, steigt die Galektin-1-Konzentration der Deziduazellen an und ermöglicht die fetomaternale Immuntoleranz.

Galektin-1 im Rahmen der Präeklampsie

Bei der Präeklampsie handelt es sich um eine Schwangerschaftspathologie, die ca. fünf Prozent der Schwangeren in Westeuropa betrifft (Weyerstahl, et al., 4. Auflage, 2013). Der Ursprung dieser plazentaren Erkrankung liegt in der Frühschwangerschaft, sie manifestiert sich mit Hypertonus und Proteinurie, jedoch erst im dritten Trimenon (Roberst and Gamille 2005 „Preeclampsia: recent insights“). Die Ätiologie der Präeklampsie ist bisher spekulativ, es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen (Rath, et al., 2010). Als prädisponierend gelten genetische Faktoren, thrombophile Gerinnungsstörungen, ein niedriger sozialer Status, Primiparität, Mehrlingsschwangerschaften und chronische Erkrankungen die zu Gefäßveränderungen führen wie Diabetes, Hypertonus und Nierenerkrankungen (Weyerstahl, et al., 2013). Eine Hypothese zur Genese der Präeklampsie geht von einer Fehldifferenzierung des villösen Trophoblasten aus, in dessen Folge es zur inadäquaten Funktion von Synzytiotrophoblasten kommt. Die Folge ist eine gestörte Apoptose, die zu Veränderungen des Gefäßendothels führt (Rath, et al., 2010). Die endotheliale Dysfunktion scheint grundlegend für die Erkrankung zu sein (Maynard, et al., 2008), (Tomimatsu, et al., 2016). Bei Schwangeren, die unter einer Präeklampsie litten, konnte eine erniedrigte plazentare Galektin-1-Konzentration festgestellt werden (Freitag, et al., 2013). Im peripher-venösen Blut fiel eine deutlich niedrigere Konzentration an Galektin-1-exprimierenden natürlichen Killer- und T-Zellen im Vergleich zu gesunden Schwangeren auf. Es wird vermutet, dass durch den Mangel an Galektin-1 exprimierenden natürlichen Killer- und T-Zellen das angeborene und erworbene Immunsystem aktiviert wird und dadurch die Präeklampsie ausgelöst wird. (Molvarec, 2011). Galektin-1 könnte somit zukünftig ein prädiktiver Biomarker in Hinblick auf die Präeklampsie-Diagnostik sein.

2.4 Die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin

Bei E-Cadherin und β -Catenin handelt es sich um bei der Fusion wichtige Adhäsionsmoleküle. Cadherine sind an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, sie befinden sich in den sogenannten Zonula adhaerens (*adhaerens junctions*). Dort vermitteln sie die Verankerung mit den Actinfilamenten des Zytoskeletts. Die Bindung an Actin benötigt allerdings die Beteiligung der Catenine (Schmitz, 1. Auflage, 2007).

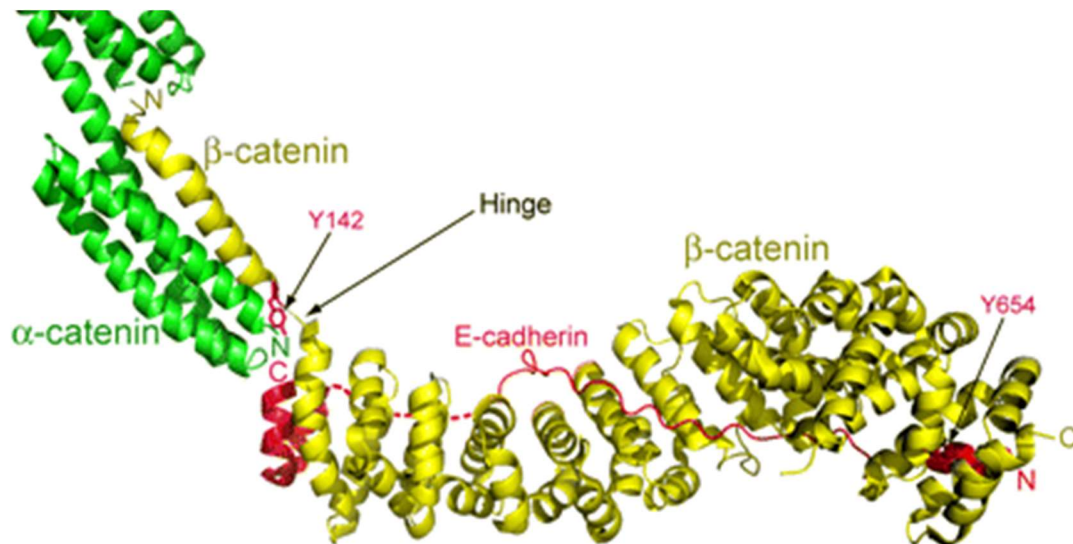


Abbildung 3: Kristallographische Darstellung des E-Cadherin-β-Catenin-Komplex im Rahmen der Zelladhäsion (Xu, et al., 2007).
β-Catenin (gelb), E-Cadherin (rot)

Cadherine werden als transmembrane Glykoproteine, die kalziumabhängig die Zelladhäsion vermitteln, definiert und werden gewebespezifisch exprimiert. Sie haben somit einen unmittelbaren Einfluss auf die Morphogenese von Organen (Tekeichi, 1993), (Nollet, et al., 2000). Bis heute sind etwa 40 unterschiedliche Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt. Zu den bekanntesten und am besten erforschten Cadherinen zählt das E-Cadherin. Sein Präfix verdankt das epitheliale E-Cadherin seinem Vorkommen: Es findet sich an der basolateralen Membran, in der Zona adhaerens der Epithelzellen (Schmitz, 1. Auflage, 2007).

In den Epithelien hat E-Cadherin im Wesentlichen zwei Aufgaben: Die Etablierung und Stabilisierung der Zellpolarität, und die Aufrechterhaltung des Gewebeverbandes (Ozawa, et al., 1990) (Kowalczyk, et al., 1996).

Für die Zelladhäsion ist E-Cadherin nicht alleine verantwortlich. Seiner adhäsiven Funktion kann das Strukturprotein nur im sogenannten Cadherin-Catenin-Zelladhäsions-Komplex nachkommen. Über die zytoplasmatische Domäne ist das Molekül über β-Catenin bzw. Plakoglobin und α-Catenin mit dem Zytoskelett verbunden (Boller, et al., 1985). Wichtigster Bindungspartner ist dabei das β-Catenin.

2.5 Syncytin

Syncytin dient in dieser Studie dem Nachweis der Synzytiumbildung, denn Syncytin ist elementar für die Fusion von Trophoblastzellen. Dieses Hüllprotein ist ein humanes, endogenes Retrovirus (HERV) und wird von allen Trophoblasttypen im Rahmen der Plazentation exprimiert (Malassiné, et al., 2005). Syncytin wird durch seine fusogene Funktion charakterisiert. Dabei agiert es als Mediator zwischen den Trophoblastzellen (Blond, et al., 2000), (Than, et al., 2014). Bei Untersuchungen von Schwangerschaftspathologien, wie zum Beispiel IUGR¹ (intrauterine growth restriction), HELLP und Präeklampsie² fiel auf, dass diese häufig mit einer erniedrigten mRNA- und Protein-Expression von Syncytin 1 und Syncytin 2 in Plazentagewebe und kultivierten Zytotrophoblastzellen einhergehen (Langbein, et al., 2008), (Knerr, et al., 2004), (Vargas, et al., 2011).

2.6 Die Physiologie der Frühschwangerschaft - Trophoblasten als Voraussetzung einer erfolgreichen Schwangerschaft

Dieses Kapitel fokussiert auf die humane Plazentogenese und die Trophoblastzellen. Diese sind essentiell für die Implantation der Blastozyste und damit die Grundlage für eine erfolgreiche Schwangerschaft.

2.6.1 Implantation, Plazentation und die Rolle der Trophoblastzellen

Zwischen dem dritten und vierten Tag nach der Befruchtung erreicht die in diesem Entwicklungsstadium als Morula bezeichnete befruchtete Eizelle den Uterus. Ein bis zwei Tage später hat sich aus der Morula die Blastozyste entwickelt: Der Embryoblast ist nun von einer trophoblastären Zellschicht umgeben. Die Ausbildung dieses Trophoblastepithels ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft, denn die Trophoblasten sind verantwortlich für die Adhäsion und Implantation des

¹ **IUGR:** intrauterine growth restriction, intrauterine fetale Wachstumsverzögerung

² **Präeklampsie; HELLP:** hypertensive Schwangerschaftserkrankung; sehr gefährliche Variante der Präeklampsie mit Hypertonus, Hämolyse, Transaminasenerhöhung und Thrombozytopenie (hemolysis, elevated liver function test, low platelet counts)

Embryos in das Endometrium des Uterus. Dies erfolgt am sechsten bis siebten Tag post conceptionem (Schneider, et al., 2006).

Bei der Einnistung differenziert sich der Trophoblast in zwei Schichten: den Synzytiotrophoblasten und den Zytotrophoblasten (Abbildung 4). Die inneren Zytotrophoblasten umhüllen den Embryoblasten und dienen als Stammzellreservoir. Die äußeren, am mütterlichen Gewebe unmittelbar anliegenden Trophoblastzellen verschmelzen zum Synzytiotrophoblasten. Dieser mehrkernige Zellverband ohne Zellgrenzen wird als Synzytium bezeichnet. Der Vorgang der Synzytiumbildung wird als initialer Prozess der Plazentaentwicklung angesehen (Schneider, et al., 2006) (HumanEmbryology13).

Implantation 6.-7. Tag

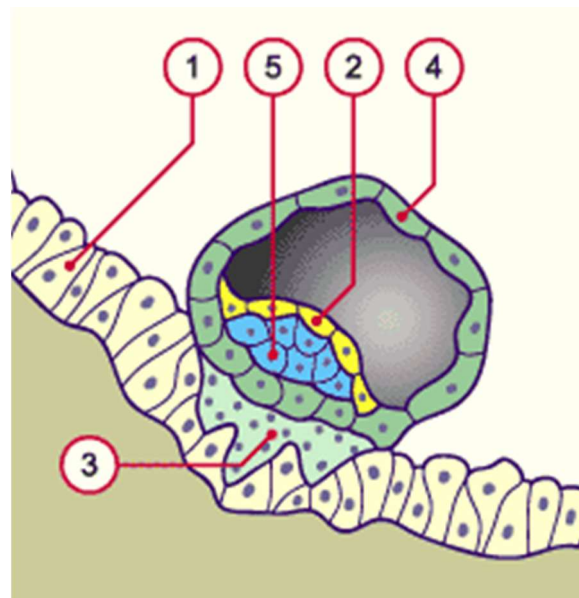


Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Implantation einer befruchteten Eizelle im Uterusepithel. (HumanEmbryology13)

- (1) Uterusschleimhautepithel
- (2) Hypoblast
- (3) Synzytiotrophoblast
- (4) Zytotrophoblast
- (5) Ektoderm

Die Plazenta ist das zentrale Bindeglied im fetomaternalen Kommunikationssystem (Kleinstein, et al., 2000). Ein kontinuierliches intrauterines Wachstum des Feten kann nur durch den Austausch von Substanzen zwischen dem maternalen und fetalen Blut über die Plazenta gewährleistet werden. Die Plazenta hat die essentielle Funktion, dem Fetus während der Schwangerschaft als Lunge, Gastrointestinaltrakt, Niere,

Leber und endokrines Organ zu dienen (Künzel, et al., 2000). Einen Überblick über die unterschiedlichen fetomaternalen Kontaktflächen gibt die Tabelle 4:

Fetale Kontaktzone	Mütterliche Kontaktzone	Hauptfunktionen
Synzytiotrophoblast - Zottenumkleidung	Blut, zirkulierende Immunzellen	bidirektionaler Stoffaustausch, Hormonproduktion
Extravillöse invadierende Zytotrophoblastzellen	Dezidua, gewebständige Immunzellen	Verankerung, Regulation des Plazentawachstums
Vaskuläre Trophoblastzellen	Blut, Dezidua	Weitstellung der Spiralarterien, Sicherstellung der Blutversorgung der Plazenta
Synzytiale Knoten, trophoblastäre Mikrovesikel und Exosomen	Blut, gesamter Organismus	Einfluss auf den mütterlichen Organismus, z.B. auf das Immunsystem und Endothel
Chorion	Dezidua capsularis	Bildung der Eihaut, Hülle für Fruchtwasser, geringer Sauerstoffaustausch
fetale Zellen	Blut	unklar

Tabelle 4: Fetomaternale Kontaktflächen (Markert, et al., 2017)

2.7 Das Trophoblastzellmodell

Grundlage unserer *In-vitro*-Studie war ein seit dem Jahr 1968 etabliertes Trophoblastzellmodell (Pattillo, et al., 1968). Die Zelllinie BeWo entstammt einem humanen Chorionkarzinom, das sich als Standardmodell zur Untersuchung trophoblastärer Proliferations- und Differenzierungsprozesse eignet. *In-vitro*-Studien an Plazentagewebe sind nur erschwert durchzuführen, da die Zellen wenige Stunden postnatal absterben. Eine gute Alternative stellt die immortalisierte Zelllinie BeWo dar: Die Zelllinie weist morphologische Merkmale der Trophoblastzellen auf. So exprimieren auch BeWo-Zellen Markerenzyme und sezernieren Hormone (Genbavec, et al., 2011), (Sonnegaard Poulsen, et al., 2013).

3 Zielsetzung

„Es ist eigentlich paradox: Will man die Funktion eines Gens erforschen, muss man das Gen erst „ausschalten“, damit man etwas über seine Rolle im Netzwerk der Regulationsmechanismen erfährt.“ schreibt Sabine Schmitz im Kapitel über die Downregulation von Genen durch RNA-Interferenz (RNAi) (Schmitz 1. Auflage, 2007). Dies ist auch die grundlegende Idee der vorliegenden Arbeit. In den letzten Jahren wurden in unserer Arbeitsgruppe zahlreiche unterschiedliche Aspekte im Zusammenspiel von Trophoblastzellen und Galektin-1 untersucht. So wissen wir heute beispielsweise, dass die Stimulation von Trophoblasttumorzellen mit Galektin-1 zu einer gesteigerten Synzytiumbildung führt, die entscheidend für die erfolgreiche Implantation einer Schwangerschaft ist.

Basierend auf der Tatsache, dass die Stimulation mit Galektin-1 Trophoblastzellen zu einer höheren Fusionsrate bewegt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Mangel von Galektin-1 einen negativen Einfluss auf das Fusionsverhalten und somit die Synzytiumbildung von Trophoblastzellen haben kann. Dies hätte negative Auswirkungen auf die spätere Implantation eines Fetus. Um die Fusionsmechanismen besser zu verstehen, wurde ebenfalls ein Augenmerk auf die Adhäsionsproteine E-Cadherin und β -Catenin gelegt. Welchen Einfluss hat die Galektin-1-Expression auf diese, für die Fusion elementaren Adhäsionsmoleküle?

4 Material

Dieses Kapitel führt alle verwendeten Materialien dieser Arbeit tabellarisch auf. In der linken Tabellenspalte stehen die Namen der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper. Auf der rechten Seite sind die dazugehörigen Bezugsquellen aufgeführt (Vgl. (Pestka, 2013), modifiziert und erweitert).

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Adhesive Film (Abdeckfolie) MicroAmp® für RT-PCR	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Adhesive Film Applikator MicroAmp®	Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland
Chamberslides, 8-Well	Nalge-Nunc; Rochester, USA
Deckgläser „Thermo Scientific“ 24x60mm	Menzel-Gläser; Braunschweig, Deutschland
Digitales Kamerasystem, AxioCam MRm	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank, -20°C	Siemens; München, Deutschland
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific; Waltham, USA
Kamerasystem JVC	JVC; Yokohama, Japan
Kryoröhrchen	Simport; Beloeil, Kanada
Kühlschrank, 4°C	Liebherr; Biberach an der Riss, Deutschland
Lichtmikroskop Diaplan	Leitz; Wetzlar, Deutschland
Mastercycler Gradient für Reverse Transkription	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
NanoPhotometer™ für RNA-Extraktion	Implen; München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld; Lauda-Königshofen, Deutschland
NucleoSpin-Filter für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® RNAII Säule für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
Objektträger Superfrost®	Menzel-Gläser; Braunschweig, Deutschland
Optical Fast 96-Well-Platte für RT-PCR	Applied Biosystems; Foster City, USA
PCR Eppendorf Reaktionsgefäße, 0,5ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 1 µl – 50µl	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipet Boy“	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipetten für Pipet Boy 2 ml – 25 ml, Falcon	Becton Dickinson; New-Jersey, USA
quadriPERM (Zellkulturgefäß)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Reagenzgläser	Sommerschmied; Appen, Deutschland
RNase-freie Reaktionsgefäße	Biozym; Oldendorf, Deutschland
Rüttler	Edmund Bühler; Hechingen, Deutschland
Sammelgefäß für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
Epson Perfection Scanner 3170 Photo	Epson; Long Beach, USA
Spektralphotometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare; Buckinghamshire, England
Sterilwerkbank	Uniequip; Planegg, Deutschland
Sterile Filter Spitzen, 1000µl, 100µl, 20µl, 10µl	Biozym; Oldendorf , Deutschland
Stickstofftank	Talor-Wharton; Theodore, USA
RNase Zap	Applied Biosystems/ Ambion; Austin, USA
Tischzentrifuge Mini Spin®	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Tubes, 50 ml, Falcon	Beckton Dickinson; New-Jersey, USA
Waage „Sartorius“	Kremer und Kreiler Laborgeräte; München, Deutschland
Wärmeschränk	Binder; Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL); Burgwedel, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Wellplatten Multiwell™, 24-Well	Falcon, Beckton Dickinson; New-Jersey, USA
Zellkulturflasche T75 cm ²	Falcon, Beckton Dickinson Labware; New-Jersey, USA
Zellscraper	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge	Hermle; Wehingen, Deutschland
Halb-Mikro-Küvette 10x4 mm, Lichtweg 10 mm	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland

4.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	B. Braun; Melsungen, Deutschland
Ethanol	Apothekenbedarf der LMU
Methanol	Apothekenbedarf der LMU

4.3 Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Amphotericin B 250 µg/ml	Biochrom; Berlin, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) Cell culture freezing medium	Gibco®, Life Technologies; Carlsbad, USA
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom; Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA; Pasching, Österreich
PBS Dulbecco	Biochrom; Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/10.000 µg/ml	Biochrom; Berlin, Deutschland
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g / 0,2 g)	Biochrom; Berlin, Deutschland

4.4 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM/FCS-Medium	DMEM + 10% FCS + 3,7 g/l NaHCO ₃ + 4,5 g/l D-Glucose + 1,028 g/l stable glutamine + Na-Pyruvate
DMEM/FCS-Medium mit Antibiotika und Antimykotikum	DMEM + 10% FCS + 3,7 g/l NaHCO ₃ + 4,5 g/l D-Glucose + 1,028 g/l stable glutamine + Na-Pyruvate + Amphotericin B 250 µg/ml + Penicillin/Streptomycin 10.000 U/10.000 µg/ml

4.5 Antikörper

4.5.1 Immunzytochemie

Bezeichnung	Hersteller
Anti-β-Catenin, rabbit IgG polyclonal, Ausgangskonzentration: 100µg/ml	Diagnostic BioSystems; Pleasanton, USA
Anti-E-Cadherin, mouse IgG, monoclonal, Klon: HECD-1, Ausgangskonzentration: 100 µg/ml	Calbiochem; Beeston Nottingham, UK
Anti-Galektin-1, rabbit IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 500 µg/ml	R&D Systems; Minneapolis, USA

4.5.2 Doppelimmunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller
Primärantikörper	
Anti-Galektin-1, goat IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 100 µg/ml	R&D Systems; Minneapolis, USA
Anti-E-Cadherin, mouse IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 100 µg/ml	Calbiochem; Beeston Nottingham, UK
Anti-β-Catenin, rabbit IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 100 µg/ml	Diagnostic BioSystems; Pleasanton, USA
Anti-Syncytin, rabbit IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 100 µg/ml	Abnova; Taipei City, Taiwan
Sekundärantikörper	
Donkey-Anti-Goat Cy-3-IgG (Indocarbocyanin), polyclonal, Ausgangskonzentration: 1,6 mg/ml	Dianova; Hamburg, Deutschland
Rabbit-Anti-Mouse Cy-2-IgG (Carbocyanin), polyclonal, Ausgangskonzentration: 1,6 mg/ml	Dianova; Hamburg, Deutschland
Goat-Anti-Rabbit Cy-2-IgG, polyclonal, Ausgangskonzentration: 1,5 mg/ml	Dianova; Hamburg, Deutschland

4.6 Farbstoffe Fluoreszenzfärbung

Bezeichnung	Hersteller
Vybrant Cell-Labeling Solutions	Molecular Probes, Scotland

4.7 Zellkultur: Basiszelllinien und Kulturmedien

Grundlage der Untersuchungen waren die BeWo-Zellen einer Zelllinie aus einem Chorionkarzinom entstammend. Diese Zellen wurden aus einem Tumor isoliert und als Zelllinie etabliert. (Schmitz, 1. Auflage, 2007)

Die Chorionkarzinomzellen dienen als Modell für Trophoblastzellen. Um den Einfluss von Galektin-1 auf die Eigenschaften dieser Zellen zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Gruppen von Chorionkarzinomzellen verwendet - zum einen konventionelle Chorionkarzinomzellen einer Zelllinie und zum anderen genetisch veränderte Chorionkarzinomzellen, wie in Tabelle 5 dargestellt.

Bezeichnung	Hersteller
BeWo	European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, England
BeWo, Galektin 1 stabil gesilenced; Knockdown Vektor Ad-shGal1, Zielgen: Galektin 1	Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Deutschland
BeWo, Kontrolle stabil gesilenced; Knockdown Vektor: Ad-shRNA (CAACAAGATGAAGAGCACCAA), Zielgen: nicht-kodierende Sequenz auf der DNA	Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Deutschland
BeWo, Galektin 1 transient gesilenced; Knockdown Vektor: Lenti-shGal1, Zielgen: Galektin 1	Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Deutschland
BeWo, Kontrolle transient gesilenced, Knockdown Vektor: Lenti-shRNA (CAACAAGATGAAGAGCACCAA), Zielgen: nicht-kodierende Sequenz auf der DNA	Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zelllinien

4.7.1 Zelllinien

Chorionkarzinomzelllinie BeWo

Als Basiszelllinien wurden humane Chorionkarzinomzellen BeWo (European Collection of Cell Cultures; Salisbury, UK) verwendet. Bei allen Vorversuchen waren die gentechnisch unveränderten Zellen die Basis.

BeWo-Zellen, Galektin-1 transient silenced

Alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden zuerst mit transient gesilenceden BeWo-Zellen (Sirion Biotech GmbH; Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe von Lentiviren wurde das kodierende Gen für Galektin-1 auf

DNA-Ebene blockiert. Ein signifikantes Knockdown³ von 70 Prozent des Galektin-1 war 72 Stunden nach Zellkultivierung festzustellen.

Eine adäquate Kontrollgruppe waren die sogenannten Non-Target-silenced BeWo-Zellen. Hier wurde das Procedere der RNA-Interferenz für eine nicht-kodierte Region auf der DNA angewandt. Diese Zellen haben eine natürlich hohe Konzentration an Galektin-1 und werden in dieser Arbeit als Kontrollgruppe bzw. als Kontrolle bezeichnet.

Die Zellen wurden kryokonserviert und in gefrorenem Zustand geliefert. Da sie ihre Eigenschaften gesichert nur über 72 Stunden behielten (Abbildung 5), wurden die transient gesilenceden Zellen direkt für Versuche verwendet, ohne sie vorher erneut zu kultivieren.

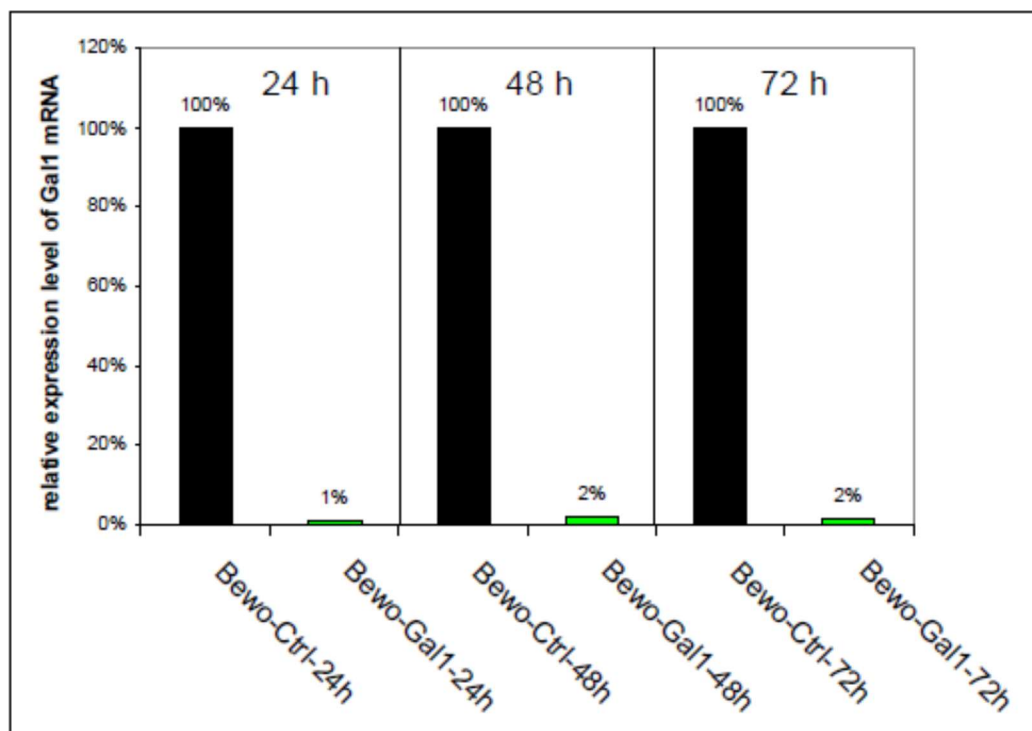


Abbildung 5: Galektin-1-mRNA-Expression, der transient Galektin-1 gesilenceden BeWo-Zellen (Bewo-Gal1) und der zugehörigen Kontrollzellen (Bewo-Ctrl), 0 bis 72 Stunden nach Kultivierung; (© SIRION Biotech GmbH)

³ Gen-Knockdown: Die Genexpression wird auf der RNA-Ebene durch RNA-Interferenz verhindert. Die Gene bleiben dabei unverändert (Vargas, et al., 2012).

BeWo-Zellen, Galektin-1 stabil silenced

Alle Versuchsreihen wurden mindestens zweifach wiederholt, bei der zweiten Versuchsreihe mit stabil gesilenceden BeWo-Zellen (Sirion Biotech GmbH; Martinsried, Deutschland). Mit Hilfe von Adenoviren, die zur Gruppe der Retroviren gehören, wurde auf RNA-Ebene in das Genom eingegriffen und Galektin-1 ausgeschaltet. Bei dieser Generation stabil gesilenceder BeWo-Zellen gelang der *Firma Sirion Biotech* zum ersten Mal eine Kockdown-Quote von 99%.

Hier existiert ebenfalls eine korrespondierende Gruppe Non-Target gesilenceder BeWo-Zellen.

Die stabil gesilenceden Zellen wurden ebenfalls kryokonserviert und tiefgefroren geliefert, allerdings wurden diese Zellen vor Beginn der Versuche für sieben Tage kultiviert.

Results	Target Gal1	Reference PPIA	Δ Cp	$\Delta \Delta$ Cp	%Target expr rel. to Ref
Non Target Ctrl	20,50	23,03	-2,53	0,00	100%
sh Gal1-124	26,32	22,63	3,69	6,22	1%

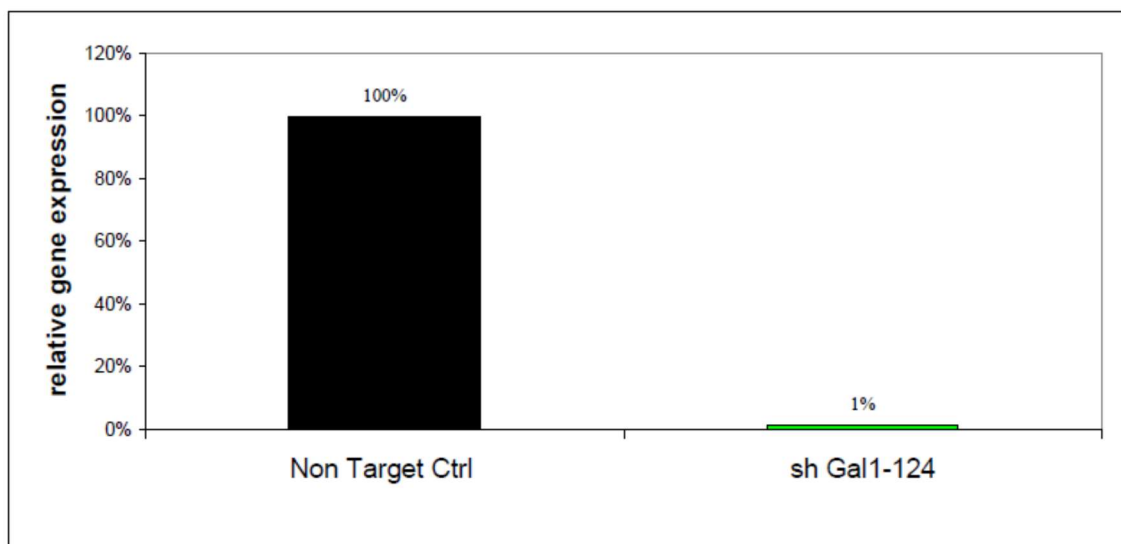


Abbildung 6: Galektin-1-mRNA-Expression, der stabil Galektin-1 gesilenceden BeWo-Zellen (sh Gal1-124) und der korrespondierenden Kontrollgruppe (Non Target Ctrl). Die Kontrollgruppe wies zu 100 % eine Galektin-1-Expression auf, bei den stabil gesilenceden BeWo-Zellen hingegen nur 1 % der Zellen (© SIRION Biotech GmbH).

4.8 Software

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM 7500 Fast	Applied Biosystems; Foster City, USA
Axio Vision, V.4.5	Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Gimp® Bildbearbeitungsprogramm	GIMP (GNU Image Manipulation Program): Freies Bildbearbeitungsprogramm unter der GNU General Public License (GLP)
Revelation Software	Revelation Software Concepts; Doncaster, Australien
SPSS für Windows, Social Sciences Computer Software Version V.15.01	SPSS Inc.; Chicago, USA

4.9 Reagenzien und Lösungen für explizite Versuche

4.9.1 Immunzytochemie

Bezeichnung	Hersteller
Eindeckmedium Aquatex®	Merck; Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Apothekenbedarf der LMU
Substrat Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) plus	Dako; Glostrup Dänemark
Vectastain Elite ABC-Kit mouse IgG	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Vectastain Elite ABC-Kit rabbit IgG	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Vectastain Elite ABC-Kit goat IgG	Vector Laboratories; Burlingame, USA

4.9.2 Doppelimmunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller
Eindeckmedium Vectashield Mounting Buffer with 4',6'diamino-2-phenylindole (Dapi)	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Ultra V Block	Labvision, Fremont; USA
Verdünnungsmedium S322	Dako, Glostrup; Dänemark

4.9.3 RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Real-time RT-PCR

Bezeichnung	Hersteller
RNA Extraktion	
β-Mercaptoethanol	Merck; Darmstadt, Deutschland
Membran Desalting Buffer (MDB)	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNAII Kit	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
RA1, RA2, RA3 Buffer	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
rDNase	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
Reaction Buffer für rDNase	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel; Düren, Deutschland
Reverse Transkription	
25x dNTP Mix	Applied Biosystems; Foster City, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems; Foster City, USA
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Applied Biosystems; Foster City, USA
Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems; Foster City, USA
Oligo-dT Primer	Applied Biosystems; Foster City, USA
RNase Inhibitor	Applied Biosystems; Foster City, USA
10x RT Buffer	Applied Biosystems; Foster City, USA
Real-time RT-PCR	
Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems; Foster City, USA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems; Foster City, USA
Primer	
GAPDH (Hs99999905_m1)	Applied Biosystems; Foster City, USA
β-ACT (Hs00242273_m1)	Applied Biosystems; Foster City, USA
Gal 1 (Hs00169327)	Applied Biosystems; Foster City, USA
β-Catenin (Hs00170025)	Applied Biosystems; Foster City, USA
E-Cadherin (Hs00170423)	Applied Biosystems; Foster City, USA

4.9.4 Bradford-Assay, ELISA

Bezeichnung	Hersteller
Bradford-Assay	
Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad; München, Deutschland
Bradford-Standard, Protein Assay Standard II	Bio-Rad; München, Deutschland
Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10x4x45 mm)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Zelllysepuffer zusammengesetzt aus:	
Lysis Buffer 10 (entstammt dem Surveyor TM IC - Human Total β -Catenin Immonoassay)	R&D Systems; Minneapolis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
ELISA	
Mouse-Galectin-1-ELISA-Kit, Bestellnummer: DY1245	R&D Systems; Minneapolis, USA
Human-sE-Cadherin-ELISA-Kit Bestellnummer: DCADE0	R&D Systems; Minneapolis, USA
Human-total- β -Catenin-ELISA-Kit Bestellnummer: DYC4225-2	R&D Systems; Minneapolis, USA

5 Methoden

5.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Um einer infektiösen Kontamination vorzubeugen, wurde die Zellkultivierung bei allen Versuchen mit sterilen Medien, Materialien und Lösungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und einer atmosphärischen Konzentration von 5% CO₂. Es kamen keine Antibiotika oder Antimykotika zum Einsatz.

5.1.1 Zellkultivierung

Die Zelllinien wurden in T75 Zellkulturflaschen (75 cm²) kultiviert. Als adhärent wachsende Zellen bildeten sie innerhalb von sieben Tagen ein Monolayer, d.h. zu diesem Zeitpunkt hatte sich ihr Wachstum über den Großteil des Flaschenbodens ausgebreitet.

Passagierung der Zellen

Nach ca. sieben Tagen befand sich in der Zellkulturflasche ein geschlossener, konfluenter Monolayer, der passagiert wurde. Denn bei einer zu hohen Zelldichte sinkt die Proliferationsrate stark ab. (Lindl, et al., 6. Auflage, 2008)

Die Zellpassagierung erfolgte nach dem vollständigen Entfernen des Zellkulturmediums und dem Spülen mit phosphatgepufferter Salzlösung PBS. Die Chorionkarzinomzellen wurden dabei mit einer Trypsin-EDTA-Lösung für 9 min. bei 37°C inkubiert. Trypsin ist eine Protease. Bei kurzer Einwirkzeit lösen sich die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche, bei langer Einwirkzeit wirkt Trypsin zytotoxisch. EDTA löst die Zell-Zell-Verbindungen, indem es zweiwertige Kationen komplexiert, welche die Zellmembranproteine stabilisieren (Gstraunthaler, et al., 2013).

Um die proteolytische Reaktion der Trypsin-EDTA-Lösung zu stoppen, wurde frisches Nährmedium hinzu pipettiert. Nach gründlichem Mischen entstanden 100 µl der Zellsuspension. Diese wurde separiert und diente der Zellzählung. Die restliche Menge der Zellsuspension wurde für 5 min. bei 1.000 Upm zentrifugiert. Das hierbei entstandene Zellpellet wurde entsprechend des Ergebnisses der Zellzählung, mit

frischem Medium versetzt, so dass sich eine Million Zellen in einem Milliliter Medium befanden. Nun wurde ein Teil der Zellen wieder zurück in die Zellkulturflaschen pipettiert und weitere Zellen für Versuche abgezweigt.

Die Zellen erhielten nach 4 Tagen frisches Nährmedium. Das verbrauchte Medium wurde zuvor abpipettiert und durch 12 ml frisches Nährmedium ersetzt. Vor dem Passagieren der Zellen oder dem Mediumwechsel erfolgte eine Begutachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop. Kontrolliert wurden Vitalität, Morphologie, Wachstum und eine etwaige Kontamination der Zellkultur.

5.1.2 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden kryokonserviert von der Fa. Sirion Biotech GmbH versandt und in diesem Zustand auch bis zur Kultivierung in Stickstofftanks gelagert. Kultivierte Zellen einer niedrigen Passage konnten ebenfalls kryokonserviert gelagert werden.

Aussäen eingefrorener Zellen

Vor dem Entnehmen der Zellen aus dem Stickstofftank musste das Wasserbad auf 37°C erwärmt und die Sterilwerkbank und das Nährmedium (DMEM) vorbereitet werden.

Das Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen, mit 70%igem Ethanol desinfiziert und im Wasserbad aufgetaut. Sobald das Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) flüssig war, wurde die Zellsuspension sofort mit 10 ml Nährmedium vermischt. Dieser Arbeitsschritt musste sehr rasch erfolgen, da DMSO bei Erwärmung die Zellen abtötet, DMEM und FCS neutralisieren die zytotoxische Wirkung von DMSO. Zum Auswaschen des DMSO wurde der Falcon mit den aufgetauten Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1.000 Upm zentrifugiert. Das Medium im Überstand wurde abpipettiert und das dabei entstandene Zellpellet anschließend in 12 ml Zellkulturmedium gelöst und in eine Zellkulturflasche T75 überführt.

Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung diente das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid DMSO. Es verhindert Gefrierschäden an den Zellen, die etwa durch Kristallbildung oder durch Dehydrierung beim Einfriervorgang entstehen könnten. Es wurde im gefrorenen Zustand gelagert und musste für das Einfrieren von Zellen schonend im Kühlschrank

aufgetaut werden. Zur Kryokonservierung eignen sich nur vitale Zellen einer niedrigen Passagennummer (maximal 30), da das Einfrieren den Zellstoffwechsel stört. Trypsin musste Raumtemperatur haben und PBS und DMEM auf 37°C temperiert werden. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin aus der Kulturflasche gelöst und anschließend passagiert und gezählt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten mit 1.000 Upm. Das entstandene Zellpellet musste frei von DMEM sein, deshalb wurde es in 10 ml PBS gelöst und erneut zentrifugiert.

Alle folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis gekühlt und sehr zügig statt. DMSO ist in flüssigem Zustand zytotoxisch. Durch die kühle Umgebung verlangsamt sich der Zellstoffwechsel, das DMSO beschädigt die Zellen deshalb innerhalb weniger Minuten nicht. Das überstehende PBS wurde abpipettiert und die Zellen dementsprechend mit dem Einfriermedium DMSO zu einer Zellsuspension vermischt. Portioniert zu je fünf Millionen Zellen pro Milliliter wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Einfrierampulle) abgefüllt.

Zur sukzessiven Akklimatisierung lagerten die Zellen über Nacht in einem Gefrierschrank bei -80°C. Im Anschluss wurden die gefrorenen Zellen in den Stickstofftank überführt, dort ist eine langfristige Lagerung für spätere Versuchsreihen möglich.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um das Wachstum zu kontrollieren oder um Versuche mit einer bestimmten Zahl an Zellen durchzuführen, musste die Anzahl der Zellen regelmäßig festgestellt werden. Hierfür wurden von der bei der Zellpassagierung entstandenen Zellsuspension 25 µl mit 50 µl PBS und 25 µl Trypanblau in einem Falcon vermischt. Anschließend wurde ein Teil der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen, so dass diese vollständig benetzt war. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

Bei der Trypanblau-Färbung handelt es sich um eine Ausschlussfärbung, denn der Farbstoff dringt selektiv nur in nicht vitale Zellen ein, während lebende Zellen im Mikroskop leuchtend hell erscheinen.

In die Zellzählung gingen lediglich die vitalen Zellen in allen vier Großquadranten des Hämozytometers ein. Die Zellzahl pro ml Suspension errechnet sich durch die Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \left(\frac{\text{Zellzahl}}{4} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Bei dem Faktor 10^4 handelt es sich um den festgelegten Kammerfaktor, der die Größe der Neubauer-Zählkammer beschreibt. Der Verdünnungsfaktor betrug 10.

5.2 Immunzytochemie

Mit Hilfe der immunzytochemischen Färbungen kann die Konzentration von E-Cadherin und β -Catenin analysiert werden. Zusätzlich wurden Wachstum und Stabilität der Zellmembranen untersucht.

Das Vorgehen bei der immunzytochemischen Färbung der Oberflächenproteine E-Cadherin und β -Catenin ist prinzipiell gleich. Allerdings werden jeweils andere Primär- und Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Einwirkzeiten verwendet.

Die Analyse der Oberflächenproteine E-Cadherin und β -Catenin beruht auf zwölf voneinander unabhängigen Färbungen.

5.2.1 Prinzip

Unter der Immunzytochemie wird die Darstellung antigener Strukturen auf Zellen und Geweben in histologischen Präparaten, mit Hilfe daran bindender Antikörper-Farbkomplexe verstanden (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007).

Für die Immunzytochemie eignen sich monoklonale Antikörper besonders gut. Sie richten sich gegen ein einzelnes Epitop (Mulisch, et al., 18. Auflage, 2010). Die Produktion monoklonaler Antikörper ist zurückzuführen auf einen einzigen B-Lymphozyten. Dieser wird kloniert und als Zelllinie kultiviert. Somit eignen sich monoklonale Antikörper für Forschung und Diagnostik, da sie mit hoher Spezifität an einzelne Moleküle binden. Eine physiologische Immunantwort hingegen ist stets polyklonal, die Antikörper richten sich gegen mehrere Epitope des Antigens.

Die Zellen wurden mit Hilfe des Standardverfahrens der Immunperoxidase gefärbt. Dazu zählt die angewandte Avidin-Biotin-Färbemethode. Diese Methode gilt als sehr sensitiv, da es möglich ist, auch geringe Antigenmengen in Präparaten zu lokalisieren. (Mulisch, et al., 18. Auflage, 2010). Dabei nutzt man die hohe Affinität des

Hühnereiweißproteins Avidin zu Biotin aus und verwendet hierfür biotinylierte Antikörper.

Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Vitamin Biotin. Es binden auf Grund der molekularen Konfiguration in der Regel weniger als vier Biotinmoleküle am Avidin. Dadurch kann sich der Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist, an die freien Stellen des Avidinmoleküls binden.

Bei der ABC-Methode wird ein fertiger Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex verwendet. Da bei der Anwendung von Avidin unspezifische Reaktionen auftreten können, wird alternativ das reinere, gentechnologisch gewonnene Streptavidin verwendet. Im Gegensatz zu Avidin ist Streptavidin nicht glykosiliert und interagiert daher nicht mit Lektinen oder anderen kohlehydrat-bindenden Proteinen im Präparat. (Mulisch, et al., 18. Auflage, 2010).

Die biotinylierten Sekundärantikörper, verbunden mit dem ABC-Komplex, konnten mit den verwendeten monoklonalen Maus Anti-E-Cadherin- bzw. Kaninchen Anti- β -Catenin-Primärantikörper binden.

Der letzte Schritt der Färbung erfolgte durch die Peroxidase, sie katalysierte die Oxidation des Farbstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC).

5.2.2 Durchführung

Es wurden 30.000 Zellen - auf ein 8-Well Chamberslide⁴ verteilt - ausgesät. Am dritten Tag wiesen die Zellen ein konfluentes Wachstum auf und konnten angefärbt werden. Mit Hilfe eines Aceton-Bades wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und anschließend für fünf Minuten mit einem PBS-Puffer gewaschen. Die weiteren Färbungsschritte erfolgten in einer Feuchtkammer, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern.

Mit dem Blockierungsserum wurden elektrostatische Ladungen im Gewebe gesättigt und somit eine unspezifische Anfärbung verhindert. Im Falle der E-Cadherin-Färbung wirkte 20 Minuten ein Blockierungsserum (vom Pferd) aus dem Vectastain-ABC-Elite

⁴ Glasobjektträger mit ablösbarer Kammerunterteilung (8 Felder)

Kit für die Mausspezies (Vector Laboratories; Burlingame, USA) ein. Bei den im Hinblick auf β -Catenin analysierten Zellen wurde ein Blockierungsserum von der Ziege für die Kaninchenspezies verwendet.

Im Anschluss wurden die Primärantikörper inkubiert:

- Anti-E-Cadherin (Ausgangskonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$) in der Verdünnung 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur,
- Anti- β -Catenin (Ausgangskonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$) in der Verdünnung 1:100 über Nacht bei 4°C.

Die folgenden Schritte sind bei beiden Färbungen identisch, mit den jeweils passenden ABC-Elite Kits.

Mit dem zweimal zweiminütigen Einwirken von PBS/Brij wurde die Oberflächenspannung herabgesetzt und der passende Sekundärantikörper konnte gleichmäßiger diffundieren. Bei letzterem handelte es sich um den biotinylierten Link-Antikörper, der den ABC-Komplex bindet (Inkubationszeit 30 min.).

Nach erneut zwei Waschungen mit PBS/Brij wurden die Objektträger für 30 Minuten mit dem ABC-Komplex inkubiert.

Es folgte eine Waschung der Objektträger mit PBS/Brij und anschließend eine Behandlung mit AEC plus (3-Amino-9-Ethylcarbazol) für ca. 10 bis 12min. an: Der exakte Zeitpunkt für die Behandlung wurde mittels Lichtmikroskop festgestellt. Sobald ein Farbumschlag zu beobachten war, wurden die Zellen fließend gewässert. Ein 30-sekündiges Hämalaun-Tauchbad folgte mit anschließend fließender Wässerung. Vor dem Eindecken der Objektträger mit Aquatex wurden die Chamberslides schließlich mit destilliertem Wasser abgespült.

5.2.3 Auswertung

Die Analyse der immunzytochemischen Färbung erfolgte mittels eines Leitz Diaplan Lichtmikroskops, die fotografische Dokumentation mit Hilfe eines digitalen Kamerasystems (JVC, Victor Company of Japan).

Bei der Auswertung wurde zum einen auf die Intensität der Anfärbung, zum anderen auf die Stabilität der Zellmembranen geachtet.

Durch die Farbtintensität konnte die Konzentration der Adhäsionsproteine β -Catenin und E-Cadherin ermittelt werden.

Nachdem E-Cadherin die Eigenschaft besitzt, nach dem Verschmelzen der Zellmembranen bei der Fusion zweier Zellen abgespalten zu werden, wurde als Indikator der Fusion nicht nur die Konzentration von E-Cadherin beurteilt, sondern zur Bestätigung die Stabilität der Zellmembranen ausgewertet.

Jedes der acht Felder eines Chamberslides wurde zur Auswertung in sechs Gesichtsfelder unterteilt und analysiert.

Ein Gesamteindruck der Färbung erfolgte bei einer 6.8-fachen Vergrößerung (x6.8), die anschließende genaue Auswertung bei einer Vergrößerung von x10 und x25. Um die Ergebnisse zu objektivieren, wurden die Objektträger durch zwei voneinander unabhängige Personen ausgewertet.

Die Beurteilung der Intensitätsanfärbung von E-Cadherin bzw. β -Catenin erfolgte nach folgenden Kategorien:

- Negativ: keine Anfärbung
- Schwach: 1-fache Anfärbung
- Mäßig: 2-fache Anfärbung
- Stark: 3-fache Anfärbung

Pro Gesichtsfeld wurde der Anteil der drei möglichen Anfärbeintensitäten der Zellen in Prozent (%) angegeben.

Mit Hilfe des IRS-Scores (Immunoreactive Score) wurden die Objektträger ausgewertet. Die Intensitäten wurden wie oben beschrieben in Werte von „0“ bis „3“ eingeordnet. Die Anzahl der angefärbten Zellen in Prozentgruppen eingeteilt, wie in Tabelle unten (Querverweis) ersichtlich.

Wert im IRS-Score	0	1	2	3	4
Auswertung	0	$\leq 10 \%$	11 – 50 %	51 – 80 %	$\geq 81\%$

Tabelle 6: Auswertungstabelle zur Beurteilung der immunzytochemischen Färbungen nach dem immunreaktiven Score (IRS).

Die Auswertungen wurden mit Hilfe des immunreaktiven Scores (IRS) zusammengefasst (Remmele, et al., 1987). Hierfür multipliziert man den größten Prozentwert als Score-Wert mit dem zugehörigen Score-Wert, der die Intensität beschreibt. Der IRS kann Werte zwischen 0 und 12 Punkten erreichen. Als Fehlerindikator wurde das Verfahren der Standardabweichung verwendet, die die Streuung der Werte um den Mittelwert anzeigt.

5.3 Doppelimmunfluoreszenz-Zytochemie

Die Immunfluoreszenz wurde im Jahre 1941 von Coons eingeführt und ist die älteste immunhistochemische Nachweismethode. (Ambrosius, et al., 1. Auflage, 1987)

5.3.1 Prinzip

Ziel der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung war es, das Oberflächenprotein Galektin-1 im Verhältnis zu dem Adhäsionsprotein E-Cadherin bzw. β -Catenin und die Syncytin-Expression darzustellen.

Zwei Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften durch Markierung mit einem Fluorochrom ermöglichten es, zwei verschiedene Proteinstrukturen gleichzeitig darzustellen.

Fluorochrome sind Stoffe mit der Fähigkeit, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und anschließend Photonen in einem anderen Wellenlängenbereich zu emittieren (Noll, et al., 1. Auflage, 2000).

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung erfolgte auch durch eine indirekte Färbemethode, ähnlich dem Prinzip der ABC-Methode bei der Immunzytochemie (Kapitel 5.2): Zuerst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an die Zellen. In einem zweiten Schritt wird ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser bindet an den Primärantikörper und markiert somit das gesuchte Antigen.

5.3.2 Durchführung

In der gleichen Art und Weise wie bei den immunzytochemischen Färbungen wurden auch für die Doppelimmunfluoreszenz-Zytochemie Zellen auf Chamberslides kultiviert und fixiert, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben.

Vor Beginn der Färbung wurden die Objektträger dreimal für je zwei Minuten in PBS gespült. Anschließend folgte eine fünfzehnminütige Inkubation mit Ultra-V-Block bei Raumtemperatur. Hierbei wurden elektrostatische Ladungen der Zellen gesättigt, um eine unspezifische Anfärbung zu verhindern. Nach Abkippen des Ultra-V-Blocks konnten die verdünnten und gemischten Primärantikörper aufgetragen werden:

In der Färbereihe A wurden die Proteine Galektin-1 und E-Cadherin gefärbt. Da die Primärantikörper von unterschiedlichen Tieren stammen (Ziege und Maus) konnte die Inkubation in einem Ansatz erfolgen.

4 µl des zuvor verdünnten Galektin-1-Antikörpers (Verdünnungsverhältnis 1:75) wurden mit 1 µl des 1:300 verdünnten Antikörpers von E-Cadherin und mit 295 µl des Dako Verdünnungsmediums gemischt.

Primärantikörper der Färbereihe B waren Galektin-1 und β -Catenin. Sie stammen von der Ziege bzw. vom Kaninchen. Die Verdünnung von Galektin-1 war ebenfalls im Verhältnis 1:75, sowie β -Catenin mit 1:600. Im Anschluss wurden 8 µl des verdünnten Galektin-1-Antikörpers mit 1 µl der β -Catenin-Verdünnung gemischt und 591 µl Dako als Verdünnungsmedium hinzugefügt.

Bei der Färbereihe C wurde der Primärantikörper Syncytin im Verhältnis 1:20 verdünnt auf die Objektträger pipettiert. Der Sekundärantikörper Goat-Anti-Rabbit-IgG, behaftet mit dem grünen Farbstoff Cy2, wurde im Verdünnungsverhältnis 1:100 aufgetragen.

Die jeweiligen Primärantikörper wurden bei 4°C für 12 bzw. im Fall von Syncytin für 16 Stunden inkubiert. Nach einer Waschung mit PBS mussten die Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirken. Da Fluorochrome eine begrenzte Lichtemission besitzen, fanden die Versuche ab diesem Schritt im Dunkeln statt. Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert und richteten sich gegen die Tierspezies des entsprechenden Primärantikörpers.

In der Färbereihe A kamen der Cy-2-konjugierte Rabbit-Anti-Mouse IgG-Antikörper und der Cy-3-konjugierte Donkey-Anti-Goat IgG-Antikörper zum Einsatz mit einer Ausgangskonzentration von 1,6 mg/ml. Der grün fluoreszierende Cy-2-Antikörper,

wurde mit Dako Verdünnungsmedium 1:100 und der rot-leuchtende Cy-3-Antikörper 1:500 verdünnt.

Sekundärantikörper der Färbereihe B waren zum einen der rot-leuchtende Cy-3-konjugierte Donkey-Anti-Goat IgG-Antikörper, zum anderen der grün-leuchtende Goat-Anti-Rabbit Cy-2-IgG-Antikörper. Diese beiden Antikörper besaßen die gleiche Ausgangskonzentration und wurden im gleichen Mischungsverhältnis verdünnt wie bei der Färbereihe A. Allerdings wirkten die beiden Sekundärantikörper nacheinander für je 30 Minuten ein.

Nach der Inkubation der Fluorochrom-behafteten Sekundärantikörper wurden die Objektträger in PBS gewaschen und anschließend getrocknet.

Zum abschließenden Eindecken diente das DAPI Mounting Eindeckmedium mit dem Kernfarbstoff 4'6-diamino-2-phenylindole. Es bindet selektiv an die DNA und lässt die Kerne blau leuchten. Vor der Auswertung wurde das Deckglas mit Hilfe von Nagellack fixiert.

5.3.3 Auswertung

Mittels eines Fluoreszenzmikroskops konnten die gefärbten Zellen bei einer 40-fachen Vergrößerung beurteilt werden. Dies geschah durch zwei unabhängige Untersucher.

Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenz Axioskop Fotomikroskop. Dieses wird durch eine Quecksilber-Höchstdrucklampe beleuchtet. Der Anregungsfilter lässt den für die Anregung der Fluoreszenz notwendigen Wellenlängenbereich passieren, der Emissionsfilter differenziert die vom Objektträger ausgehenden Lichtwellen: Das Anregungslicht wird zurückgehalten und längerwelliges Fluoreszenzlicht zum Okular weitergeleitet.

Verwendete Filter zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz:

Cy-2-Filter:	rot	Signal: grün
Cy-3-Filter:	grün	Signal: rot
Cy-2-/ Cy-3-Filter:	blau	Signal: gelb (Kokalisation)

Tabelle 7: Überblick über Fluorochrome mit zugeordneten Filtern und Fluoreszenzsignal.

Zielwerte der Analysen waren die prozentuale Zellzahl, in deren Zellmembran E-Cadherin, β -Catenin, Syncytin oder Galektin-1 exprimiert, also angefärbt waren: Bei 100 % ist das gesuchte Protein in der Zellmembran aller Zellen exprimiert, bei 0 % wird keine Zellmembran angefärbt.

Die digitale Bilddokumentation erfolgte durch das Axiocam Kamerasystem.

5.4 Fluoreszenzfärbung

Der Farbstoffspektralversuch stellt eine gute Möglichkeit dar, die Fusion von Zellen zu visualisieren und zu analysieren. Im Folgenden wird dieser Versuch kurz dargestellt.

5.4.1 Prinzip

Mittels der lipophilen Fluorochrome DiO (1,1'-dioctadecylindocarbocyanine perchlorat) und Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat) ist eine selektive Zellmembranfärbung möglich. DiO und Dil verfügen über unterschiedliche Fluoreszenzemissionen. Dabei liegt das Emissionsmaximum von Dil bei 507 nm und fluoresziert grün, das Emissionsmaximum von DiO liegt bei 571 nm und fluoresziert rot. Die Farbstoffe gehören in die Gruppe der Dialkylcarbocyanine und breiten sich durch eine passive laterale Diffusion aus. (Mulisch, et al., 18. Auflage, 2010). Zur Analyse des Fusionsverhaltens werden Zellen, gelöst in einer Zellsuspension, in zwei gleiche Anteile geteilt und jeweils mit einem der fluoreszierenden Farbstoffe DiO bzw. Dil markiert. Anschließend werden die unterschiedlich markierten Zellen wieder zusammengeführt. Kommt es im Verlauf der weiteren Kultivierung zu Fusionsprozessen, so fusionieren auch die Fluorochrome und erreichen ein neues Emissionsmaximum. Sie stellen sich in der fluoreszierenden Farbe Gelb dar. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop. Eine Quecksilberdampf Lampe erzeugte das Anregungslicht für die Fluorochrome. Die unterschiedlichen Filter im Mikroskop waren nur für die Emissionen einer bestimmten Wellenlänge, d.h. einer fluoreszierenden Farbe durchlässig.

5.4.2 Durchführung

Beide Zelllinien, Galektin-1 gesilencede und Non-Target gesilencede, wurden nach folgendem Prozedere behandelt: Ein Milliliter der Zellsuspension mit 10^6 Zellen pro Milliliter wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 min. bei 1.000 rpm

zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Milliliter DMEM aufgelöst. 250 µl der Zellsuspension wurden mit 8 µg/ml der fluoreszierender Zellfärbelösung DiO, 250 µl mit 4 µg/ml Dil inkubiert. Nach 20 Minuten Inkubation im Wärmeschrank folgten drei Waschvorgänge mit serumfreiem DMEM-Medium. Dabei wurde jeweils die Zellsuspension für fünf Minuten mit 1.500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Zellpellet erneut in DMEM-Lösung suspensiert. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet zur weiteren Kultivierung in einer antibiotika- und antimykotikumhaltigen DMEM/FCS-Lösung gelöst. Die mit DiO und Dil markierten Zellsuspensionen wurden anschließend zusammen in eine Kammer einer 24-Wellplatte gegeben. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 40 CFL und dem Kamerasystem Power Shot A620 der Firma Canon wurden die Zellen unmittelbar nach dem Aussäen fotografiert (Zeitpunkt 0 Std.). Dann folgte eine Inkubationszeit von 96 Stunden bei 37°C. Nach dieser Zeitspanne wurden beide Zellreihen erneut fotografiert.

5.4.3 Auswertung

Die Auswertung der Zellfusion erfolgte anhand zehn zufällig ausgewählter Gesichtsfelder durch zwei unabhängige Labormitarbeiter. Die Fusionsrate der Galektin-1 gesilenceden Zellreihe und der Kontrollgruppe wurde anhand der Menge an grün-, rot- und gelbgefärbten Zellen ausgewertet. Die entstandenen Zellverbände waren anhand der Gelbfärbung zu erkennen. Für die statistische Auswertung kam das Computerprogramm SPSS zur Anwendung. Als statische Methode zum Vergleich der beiden Zellreihen wurde der Wilcoxon-Test gewählt. Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

5.5 Quantitative Real-time RT-PCR (TaqMan®-PCR)

Die Real-time Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) diente zur Bestimmung der Konzentration der Oberflächenproteine auf mRNA-Ebene. Diese Analyse erfolgte mit der cDNA der zu untersuchenden Zellen. Deshalb musste vor der Durchführung der TaqMan-PCR die RNA zuerst extrahiert und in die stabilere Form der cDNA transkribiert werden.

5.5.1 Prinzip

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA amplifiziert. Dies geschieht einerseits durch periodisch unterschiedliche Temperaturen, andererseits durch Primer, die entlang einer Matrizen-DNA verlängert werden. Vor allem aber ist das Enzym DNA-Polymerase entscheidend, das den eigentlichen Schritt der DNA-Vervielfältigung durchführt. (Newton, et al., 1. Auflage, 1994)

5.5.2 Durchführung

Isolierung der RNA

Bei der Extraktion der RNA ist es wichtig, auf RNasefreie Arbeitsbedingungen zu achten. RNasen kommen in der Umwelt ubiquitär vor, sind sehr hitze- und chemikalienbeständig, und sind in der Lage, RNA abzubauen. Folgende Vorkehrungen gewährleisten einen RNasefreien Arbeitsplatz:

- Tragen von Latex-Einmalhandschuhen
- Benutzung von RNasefreien Tubes von Eppendorf
- Reinigung der Arbeitsflächen mit RNase-zerstörendem Spray (RNase Zap)

Für die RNA-Isolierung wurde der NucleoSpin® RNAII Kit der Firma Machery-Nagel verwendet und gemäß der Herstellerangaben angewendet.

Eine Millionen Zellen wurden wie bei der Zellpassagierung (Kapitel 2.1.1) mit Hilfe von Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst und in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 5.000 Upm für fünf Minuten konnte das überstehende Medium abgezogen werden. Das entstandene Zellpellet wurde nun in 350 µl RA1 Lysis Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gelöst. Dieses Zelllysate wurde mit Hilfe eines NucleoSpin-Filters bei 11.000 g für eine Minute filtriert. Mit 350 µl 70%-igen Ethanol wurde das filtrierte Lysat vermischt und auf eine NucleoSpin RNA II Säule pipettiert. Dieser Schritt diente zur Bindung der RNA an die Silica Membran. Durch die Zugabe von 350 µl Desalting Buffer (MDB) entsalzte die Membran und effektivierte den folgenden rDNase-Verdau. Die erneute Zentrifugation fand ebenfalls bei 11.000 g für eine Minute statt.

Ein DNase-Mix zur Verdauung der DNA wurde benötigt, dieser bestand aus 10 µl rekonstruierter rDNase und 90 µl Reaktionspuffer für die rDNase. 95 µl DNase Mix

inkubierten für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf der Silica Membran der NucleoSpin RNA II-Säule. Es schlossen sich insgesamt drei Waschvorgänge an, der erste mit dem Waschpuffer RA2 und die zwei folgenden mit dem Waschpuffer RA3. Die Waschung erfolgte mittels Zentrifugation. Diese trocknete die Silica Membran nach dem letzten Waschen. Im trockenen Zustand wurde die Säule in ein nucleasefreies Mikrozentrifugenröhrchen platziert und 60 µl RNase freies Wasser auf die Membran platziert. Durch erneutes Zentrifugieren bei 11.000 g für eine Minute eluierte die RNA. Die aufgrund ihrer Wasserstoffbrücken sehr instabile RNA musste umgehend bei -80°C konserviert werden.

Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird isolierte RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007).

Das Umwandeln, der aus den Zellen isolierten RNA ist notwendig, da die einsträngige RNA relativ instabil ist. Mittels des Verfahrens der Reversen Transkription wurde sie in die stabilere Form der cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die in gefrorenem Zustand gelagerten Kitkomponenten mussten für den Versuch aufgetaut werden, wurden jedoch während des ganzen Versuchs in einem Eisblock gekühlt.

Um 10 µl mRNA in cDNA umzuwandeln, wurden 10 µl des 2xRT-Mastermixes benötigt. Der 2xRT-Mastermixes wurde folgendermaßen hergestellt:

Komponente	Volumen pro Probe
10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
Oligo-dt Primer	2,0 µl
RNAse Inhibitor	1,0 µl
Nuclease-freies Wasser	3,2 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl

Komponente	Volumen pro Probe
Gesamtvolumen des 2xRT-Mastermix pro Reaktion	Σ 10,0 μ l

Tabelle 8: Komponenten des 2xRT-Mastermixes

Das benötigte Gesamtvolumen des 2xRT-Mastermixes berechnete sich nach der Anzahl der umzuschreibenden mRNA-Proben.

Pro Reaktion wurden 10 μ l mRNA und 10 μ l 2xRT-Mastermix in einem 0,5 ml PCR Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Nach kurzem An-Zentrifugieren wurden die Reaktionsgefäße im Eppendorf Mastercycler® Gradienten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Es wurde das Programm „RTAB“ gestartet: Dabei wurde die mRNA für zehn Minuten bei 25°C, für zwei Stunden bei 37°C, für fünf Sekunden bei 85°C inkubiert und abschließend bei 4°C abgekühlt.

Bis zur Durchführung der PCR konnte die cDNA im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt werden.

Quantitative Real-time-PCR (TaqMan®-PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wurde eine bestimmte Region eines DNA-Moleküls mehrfach kopiert. Dazu waren mehrere Schritte notwendig:

1. Die DNA wurde denaturiert. Durch Erhitzen auf 95°C konnte die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen werden. Durch diese Temperaturerhöhung wurden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, die beide Stränge verbinden.
2. Im darauffolgenden Schritt wurde die Temperatur zügig gesenkt, damit die entstandenen Einzelstränge sich nicht wieder aneinanderlagern. Dabei hefteten sich die Primer an, die anzeigen, welcher Abschnitt der DNA dupliziert wird.
3. Als letzter Schritt eines Zyklus wurde die DNA amplifiziert. Dies geschah durch die thermostabile DNA-Polymerase. Sie wurde aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gewonnen und wird deswegen auch Taq-Polymerase genannt. Durch ihre Hitzebeständigkeit macht es die Taq-Polymerase möglich, 40 PCR-Zyklen sequentiell laufen zu lassen.

Die PCR wurde mit Hilfe des Fluoreszenz Resonanz Energietransfers (FRET) durchgeführt. Hier wurden die verschiedenen Nukleinsäuren durch LightCycler

Sonden quantifiziert. Zu ihnen zählte auch die hier verwendete TaqMan-Sonde. Sie verfügt über einen Quencher und einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff.

Mittels Fluoreszenzmessung wurde die Konzentration der DNA während der PCR analysiert. Mit dem Konzentrationsanstieg der PCR-Produkte stieg die Fluoreszenz proportional an. Erreicht die Konzentration der exprimierten Gene und somit auch deren Fluoreszenz einen Schwellenwert, der die Hintergrund-Fluoreszenz erstmals überschreitet, wird dies als Cycle Treshhold Wert (Ct-Wert) bezeichnet.

Zur Durchführung der RT-PCR wurde der Mastermix angewandt, der aus folgendem besteht (Tabelle 9):

Komponente	Volumen pro Probe
TaqMan® Gene Expression Assay; 20x Konzentration (Primer)	1,0 µl
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix; 2x Konzentration	10,0 µl
Nucleasefreies Wasser	8,0 µl
Gesamtvolumen	Σ 19,0 µl

Tabelle 9: Rezeptur des Mastermixes für die quantitative Real-time RT-PCR

Für jede Probe wurden 19 µl Mastermix in eine 96-Well Reaktions-Mikrotiter-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 1 µl cDNA bzw. 1 µl nukleasefreies Wasser zur Reagenzienkontrolle hinzugefügt.

Um die unterschiedlichen Konzentrationen der neu synthetisierten mRNA zu relativieren, wurde ein Referenz-Gen, das sogenannte Housekeeping-Gen, als interne Kontrolle eingesetzt. Hiermit wurden Abweichungen der RNA-Ausgangsmenge normiert. Diese Normierung wird als ΔCt -Wert angegeben und berechnet sich wie folgt: Der Ct-Wert eines Referenz-Gens wird vom Ct-Wert des untersuchten Gens subtrahiert.

Housekeeping-Gene kodieren Proteine, die ubiquitär vorkommen, also in jeder Zelle exprimiert werden und sich somit als endogene Kontrolle eignen. In dieser Arbeit wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und beta-Actin (bACT) als Referenz-Gene verwendet.

Folgende vier Primer wurden für die TaqMan® Gene Expression Assays verwendet, wie in Tabelle 10 dargestellt:

Primer	Bestellnummer bei Applied Biosystems
Galektin-1	Hs00169327_m1
E-Cadherin	Hs00170423_m1
β-Catenin	Hs00170025_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
βACT	Hs00242273_m1

Tabelle 10: Primer der qualitativen Real-time RT-PCR (TaqMan®-PCR)

Bevor die Mikrotiter-Platte im 7500 ABI PRISM Fast Real-Time PCR Gerät ausgewertet werden konnte, musste sie zum Schutz vor Kontamination und Austrocknung noch mit einer MicroAmp® Abdeckfolie verklebt werden.

Das PCR-Gerät führte die PCR-Amplifikation nach folgendem Ablauf durch:

- Beginn bei 95°C für 20 Sekunden,
- im Anschluss 40 Reaktionszyklen bei 95°C für drei Sekunden und
- 30 Sekunden bei 60°C.

5.5.3 Auswertung

Die Genexpression der Zielgene Galektin-1, E-Cadherin und β-Catenin wird durch die folgende Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Quantifizierung der Proben wurde relativ zur endogenen Referenz, des Housekeeping-Gens durchgeführt und diente als Kalibrator⁵. Der normierte ΔCt Wert des Kalibrators wurde vom ΔCt Wert des gesuchten Gens subtrahiert. Um die Konzentration der Zielsequenz zu berechnen, wird ΔΔCt im Quadrat von 2^{-x} genommen, so wird die x-fache Expression bestimmt.

⁵ Kalibrator: Probe, die als Grundlage für die Erstellung vergleichender Ergebnisse dient.

5.6 ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) diene der Quantifizierung von Antigenen. Die Methode ermöglicht es, kleine Konzentrationen von Antigenen (pg/ml bis ng/ml) in Serum, Urin oder, wie in dieser Arbeit, in Zelllysaten und Zellkulturüberständen nachzuweisen. Dieser Test nutzt das Prinzip der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Spezifische Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen sind an eine Mikrotiterplatte gebunden. Es handelt sich um den sogenannten Fangantikörper, an den sich das gesuchte Antigen bindet. Ein weiterer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, bindet an den entstandenen Immunkomplex und detektiert diesen durch einen chromogenen Farbumschlag.

Um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten, mussten alle Proben die gleiche Proteinkonzentration aufweisen. Bei Untersuchungen mit Zelllysat wurden die Zellen hierfür gezählt. Die Proteinkonzentration des Zellkulturüberstandes musste mittels Bradford-Assay bestimmt werden.

5.6.1 Vorbereitung des ELISAs mit dem Bradford-Assay

Prinzip

Der Bradford-Assay diene zur Analyse der Proteinkonzentration von verbrauchten Zellkulturmedien mit Hilfe eines Spektralphotometers. Die Untersuchung beruht auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Rehm et al. beschreibt die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der Bindung des blauen Farbstoffes: 465 nm ohne Protein und 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption ab 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Rehm, et al., 6. Auflage; 2010). Anhand von Standardkurven lassen sich auf diese Weise unterschiedliche Proteinkonzentrationen von wenigen Milligramm in Flüssigkeiten bestimmen.

Durchführung

Zu Beginn des Bradford-Assays wurde das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest., die zu untersuchenden Proben in der Konzentration 1:2 mit Aqua dest. verdünnt.

Zur Kalibrierung wurde der Bradford-Standard (Konzentration 1,48 mg/ml) nach folgendem Schema mit Aqua dest. gemischt, um eine Standardkurve zu erhalten:

- 1000 µg/ml = 676 µl Standard (unverdünnt)
+ 324 µl Aqua dest.
- 800 µg/ml = 400 µl Standardlösung (aus der 1000 µg/ml Verdünnung)
+ 100 µl Aqua dest.
- 400 µg/ml = 200 µl Standardlösung (aus der 800 µg/ml Verdünnung)
+ 200 µl Aqua dest.
- 200 µg/ml = 200 µl Standardlösung (aus der 400 µg/ml Verdünnung)
+ 200 µl Aqua dest.
- 100 µg/ml = 200 µl Standardlösung (aus der 200 µg/ml Verdünnung)
+ 200 µl Aqua dest.
- 50 µg/ml = 200 µl Standardlösung (aus der 100 µg/ml Verdünnung)
+ 100 µl Aqua dest.

Der Nullwert der Standardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration entstand aus der Mischung von 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 in Aqua dest. verdünnt) mit 20 µl Aqua dest. Für die Standardansätze, die zur Ermittlung der Eichkurve dienten, wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Standards der Verdünnungsreihe mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 in Aqua dest. verdünnt) gemischt. Von den Zellkulturüberständen der Galektin-1 gesilencierten Zellen und der Non-Target gesilencierten Zellen (1:2 in Aqua dest. verdünnt) wurden je 20 µl entnommen und mit 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz vermischt.

Zuletzt wurde 1 ml der Suspensionen der Standardansätze, des Nullwertes und der Proben in eine jeweils eine Küvette pipettiert.

Auswertung

Die Analyse erfolgte durch ein Spektralphotometer, das die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm und bei linearer Regression durchführte. Zu Beginn der Messung wurden der Nullwert und die Eichkurve anhand der sechs Standards bestimmt. Bezugnehmend auf die Standardkurve konnte nun die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt werden. Dies diente zur Vorbereitung für den enzymgekoppelten Immunadsorptionstest ELISA. Um valide Ergebnisse zu erzielen durften nur Proben mit gleicher Proteinkonzentration bzw. Zellzahl verglichen werden.

5.6.2 Durchführung

Beispielhaft wird im Folgenden die Methode ELISA anhand des sE-Cadherin-ELISAs erklärt. Das Prinzip des Galektin-1 und β -Catenin-ELISAs ist identisch.

Eine 96-Well-Platte wurde mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für E-Cadherin vorbeschichtet. Standards und Proben wurden in die Wells pipettiert und inkubiert. Vom fixierten Fangantikörper wurden die E-Cadherin-Proteine gebunden. Ein Waschschrift folgte, bei dem alle ungebundenen Substanzen abgewaschen wurden. Im Anschluss wurde ein enzymgekoppelter, polyklonaler Antikörper, spezifisch für E-Cadherin, in die Wells hinzugegeben. Wiederum wurden alle ungebundenen Substanzen abgewaschen. Eine Substratlösung wurde in die Wells pipettiert, die eine enzymatische Farbreaktion auslöste, proportional zu der Konzentration von E-Cadherin. Sobald der Farbumschlag stoppte, wurde die Farbintensität gemessen. Als Referenzwerte galten dabei die Konzentrationen der Standards.

Zum spezifischen Nachweis von gelöstem E-Cadherin, β -Catenin bzw. Galektin-1 wurden kommerziell erhältliche Quantikine® ELISA-Kits von R&D-Systems nach den Angaben der Herstellerfirma verwendet. Im Detail sind die Kits in Tabelle 10 „ELISA-Kits der Firma R&D Systems“ beschrieben.

ELISA	Bestellnummer
Mouse-Galectin-1-ELISA-Kit	DY1245
Human-sE ⁶ -Cadherin-ELISA-Kit	DCADE0
Human-total- β -Catenin-ELISA-Kit	DYC4225-2

Tabelle 11: ELISA-Kits der Firma R&D Systems

Vor Beginn der ELISA-Untersuchungen wurde eine Standard-Verdünnungsreihe aus dem Trägermedium Assay Diluent und der Stammlösung aus dem jeweiligen Kit angelegt:

- Std. A: 20.000,0 pg/ml = 875 μ l Assay Diluent + 125 μ l Stammlösung

⁶ sE-Cadherin = soluble (gelöstes) E-Cadherin

- Std. B: 10.000,0 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. A
- Std. C: 5.000,0 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. B
- Std. D: 2.500,0 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. C
- Std. E: 1250,0 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. D
- Std. F: 625,0 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. E
- Std. E: 312,5 pg/ml = 500 µl Assay Diluent + 500 µl Std. F

Human-total-β-Catenin-ELISA und Mouse-Galectin-1-ELISA

Bei dem Galectin-1- und dem β-Catenin-ELISA wurden lysierte Zellen analysiert. Dazu wurden für jede Untersuchung je zehn Millionen Zellen in einem Milliliter Lysis-Puffer-10 lysiert.

Die Mikrotiterplatte des Mouse-Galectin-1-ELISAs musste vor Versuchsbeginn mit einem Fangantikörper beschichtet werden: 100 µl des Anti-Mouse-Galectin-1-Antikörpers (Spezies: Ziege) in der Konzentration 0,8 µg/ml, wurden in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und bei Raumtemperatur für zwölf Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen und mit dem Blockierungsserum Reagent Diluent für eine Stunde behandelt. Nach erneutem Waschen der Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer war die Beschichtung der 96-Well-Platte mit dem Fangantikörper abgeschlossen.

Beim Human-total-β-Catenin-ELISA war die Mikrotiterplatte bereits mit einem monoklonalen Maus-Antikörper beschichtet, der sich gegen β-Catenin richtete.

Zu Beginn des Versuchs wurden 100 µl der Probe, des Standards oder der Nullprobe in den Wells einer Mikrotiterplatte platziert. Als Nullprobe diente Assay Diluent pur. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgekippt und alle nicht-gebundenen Proteine mit einem Waschpuffer abgewaschen.

Im nächsten Schritt wurden biotinylierte Antikörper hinzu pipettiert, sogenannte Detection Antibodies, die zum Nachweis der gesuchten Proteine dienten. Diese mussten zuvor in Reagent Diluent 2 verdünnt werden. Im Fall des Mouse-Galectin-1-ELISAs wurde der Ziege-Anti-Maus-Galectin-1-Antikörper im Verhältnis 1:180 verdünnt. Der Maus-Anti-β-Catenin-Antikörper des Human-total-β-Catenin-ELISAs wurde 1:15 verdünnt.

Pro Well wurden 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut mit Waschpuffer gewaschen.

Die Wells der Mikrotiterplatte wurden jetzt mit 100 µl Streptavidin-HRP-Gebrauchslösung behandelt. Der Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist, konnte nun an das Streptavidin binden, da es Bindungsstellen für das Vitamin Biotin besitzt. Nach 20 Minuten Inkubation wurden die Reste der Streptavidinlösung mit Hilfe von Waschpuffer abgespült.

Wegen der Lichtempfindlichkeit der verwendeten Farblösung folgten die nächsten Arbeitsschritte, insbesondere die Inkubation, im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Die sogenannte Substrate-Solution-Lösung besteht aus den Farbreagenzien A und B. Diese wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend in die Wells pipettiert. Nach 20 Minuten wurde in jedes Well 50 µl Stopplösung hinzu pipettiert. Nun konnte die Mikrotiterplatte am ELISA-Reader nach Herstellerangaben innerhalb von 30 Minuten ausgewertet werden.

Human-sE-Cadherin-ELISA

Bei dieser Untersuchung wurde die Konzentration von gelöstem E-Cadherin bestimmt. Dieses wurde durch Fusion der Zellmembranen abgespalten und befand sich im Zellkulturmedium. Das verbrauchte Medium wurde nach drei Tagen Kultivierung analysiert.

Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte war mit einem monoklonalen Maus-Anti-E-Cadherin-Antikörper beschichtet. Zu Beginn der Untersuchung wurden 100 µl Assay Diluent pro Well vorgelegt und anschließend 50 µl des Standards, der Probe oder der Kontrolle hinzugegeben. Als Nullprobe diente auch hier Assay Diluent. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die ungebundenen Reste der Lösungen abgekippt und die Wells dreimal mit Waschpuffer gereinigt. Im nächsten Schritt erfolgte die Behandlung mit einem konjugierten Sekundärantikörper: Der polyklonale Anti-E-Cadherin-Antikörper war mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert. 200 µl pro Well inkubierten für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte erneut gewaschen. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit der lichtempfindlichen Farblösung, Substrate Solution behandelt. Die beiden

Komponenten Farbreagenz A und B wurden 1:1 gemischt und 200 µl in jedes Well pipettiert. 50 µl Stoplösung wurden nach 30 Minuten hinzugegeben. Die Auswertung am ELISA-Reader sollte nach Herstellerempfehlung innerhalb von 30 Minuten erfolgen.

5.6.3 Auswertung

Analysiert wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 bzw. 570 nm. Die PC-gestützte Auswertung der photometrischen Messergebnisse erfolgte durch die Revelation Software. Anhand der Standardreihe konnte die Antigenkonzentration der Proben quantifiziert werden.

5.7 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des SPSS/PC Software Pakets (Version 15.0 für Windows) wurden Daten dieser Arbeit gesammelt, statistisch ausgewertet und analysiert. Zur Analyse der Ergebnisse der Immunzytochemie wurde ein Wilcoxon-signed-rank Test durchgeführt. Dieser Test vergleicht verbundene Stichproben miteinander. Werte mit einem Wahrscheinlichkeitswert $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Galektin-1-Konzentration der gesilenceden BeWo-Zelllinien

Die Analyse, von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Färbereihen ergab: Verglichen mit der Kontrollgruppe, den Non-Target-gesilenceden Trophoblasttumorzellen ($>98\%$ Galektin-1), war eine signifikant niedrigere Expression von Galektin-1 bei der Galektin-1 gesilenceden Zelllinie ($<1\%$ Galektin-1, $p<0,001$) in der Zellmembran festzustellen. In den Abbildungen 7 A und B sind die unterschiedlichen Konzentrationen vom rot gefärbten Galektin-1 der beiden verglichenen Zellreihen zu sehen. Zu erkennen ist eine geringere Fusion der Galektin-1-gesilenceden Zellen. In Abbildung 8 ist die Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung nach dem Immunreaktiv Score (siehe Kapitel 5.2.3) als Diagramm dargestellt.

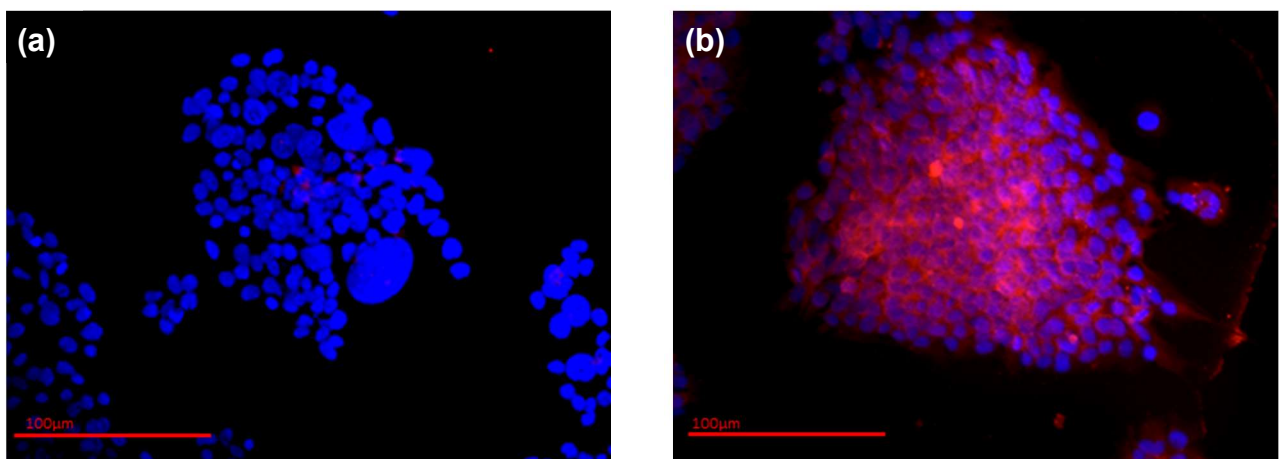


Abbildung 7: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von Galektin-1

Nachweis von Galektin-1 mittels Doppelimmunfluoreszenz-Zytochemie nach 72 Stunden Kultivierung bei den Galektin-1 gesilenceden Zellen (a) und Non-Target-gesilenceden Zellen (b).

(Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung 20x, Galektin-1 rot-fluoreszierend).

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen wurden zusätzlich qualitativ mittels ELISA bestimmt, dargestellt in Abbildung 9. Hier konnte ebenfalls die höhere Galektin-1-Konzentration der Non-Target-gesilenceden Kontrollgruppe im Vergleich zu den Galektin-1-gesilenceden BeWo-Zellen nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Konzentration von den Non-Target-gesilenceden Zellen betrug 50,46 pg/ml, die der Galektin-1-gesilenceden Zellen 18,93 pg/ml. Der SEM (standard error of the mean) lag bei der Kontrollgruppe bei 1,72 pg/ml und bei den Galektin-1 gesilenceden Zellen bei 0,54 pg/ml.

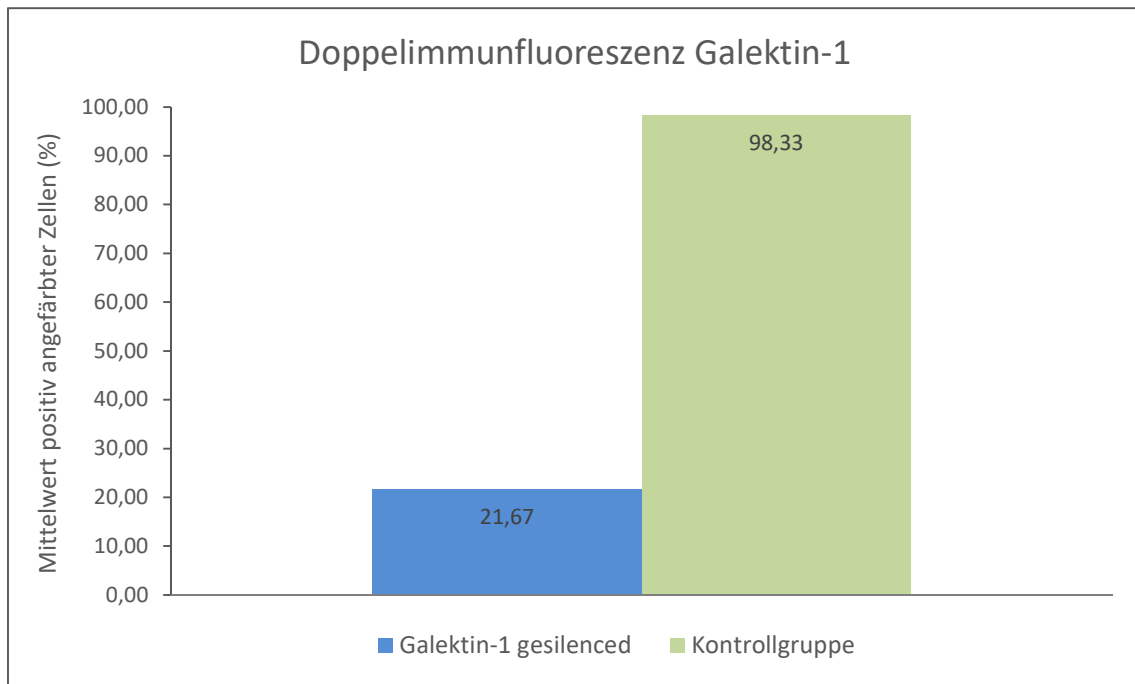


Abbildung 8: Auswertung der Zellfusion nach 72 Stunden Kultivierung im Rahmen der doppelimmunzytochemischen Färbung von Galektin-1.

Die Auswertung der Färbereihen erfolgte mittels Immunreaktiv Score (IRS) und ist in dem Diagramm dargestellt. In den Abbildungen ist ein deutlicher Unterschied der Zellfusion beider Zelllinien sichtbar.

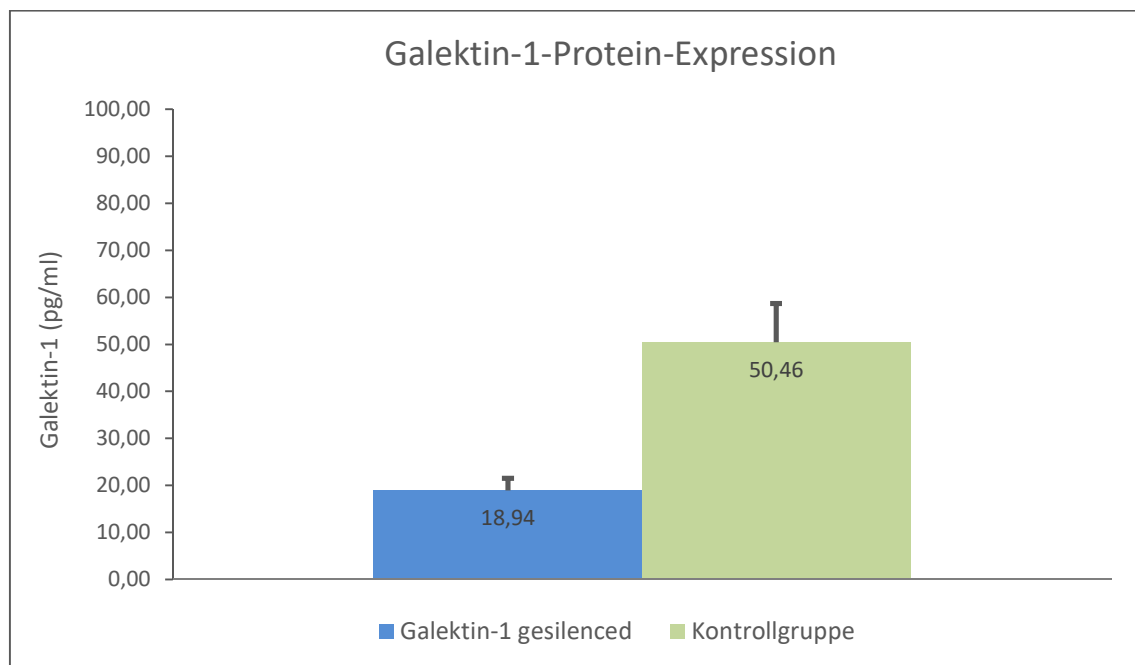


Abbildung 9: Nachweis der Galektin-1-Konzentration mittels ELISA;

Die Non-Target-gesilencede Kontrollgruppe wies eine deutlich höhere Konzentration an Galektin-1 im Vergleich zu den Galektin-1-gesilenceden BeWo-Zellen auf.

Die Erfolgskontrolle des Galektin-1-Silencings auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR (TaqMan-PCR®) durchgeführt. Die Galektin-1-gesilencenden Zellen wiesen eine signifikant niedrigere Konzentration an Galektin-1-mRNA im Vergleich zu den Non-Target-gesilencenden Zellen auf. Die relative Quantifizierung ergab eine 0,01-fache Galektin-1-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 10).

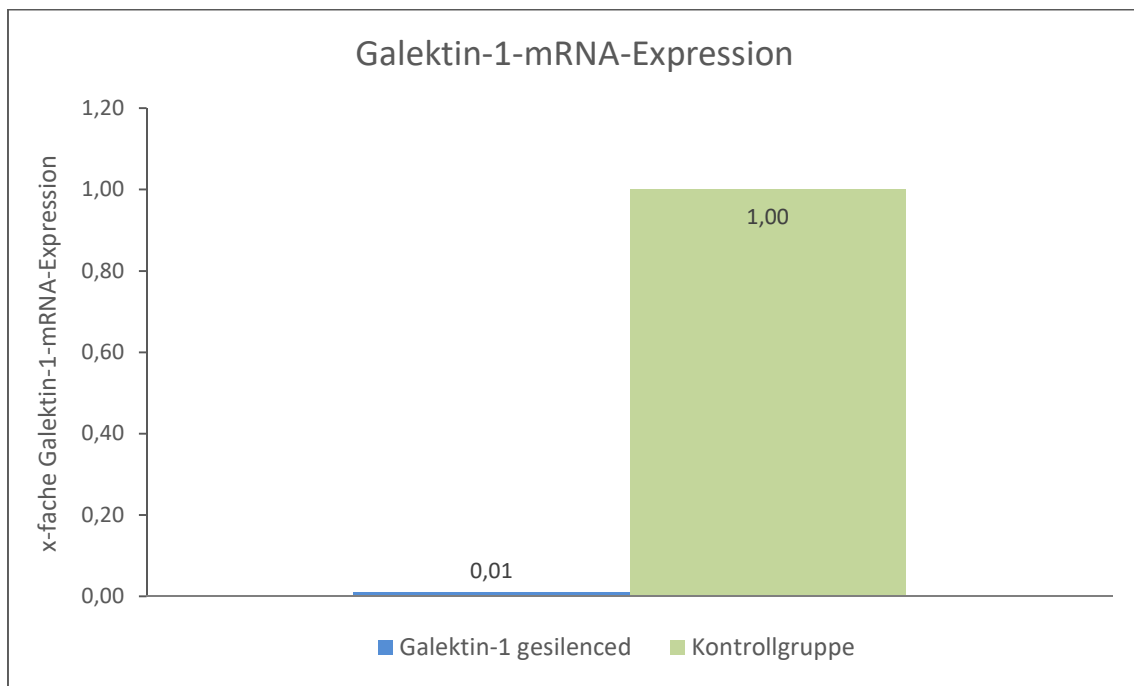


Abbildung 10: Graphische Auswertung der Galektin-1-mRNA-Expression.

Die Galektin-1-gesilencenden Trophoblasttumorzellen BeWo wiesen eine 0,01-fach niedrige Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

6.2 Adhäsionsmoleküle

E-Cadherin und β -Catenin haben als Adhäsionsmoleküle einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfusion. Im Rahmen dieser Studie sollte auch die Auswirkung der Galektin-1-Expression auf die Adhäsionsmoleküle untersucht werden. Des Weiteren dienen diese Proteine als indirekte Fusionsindikatoren.

6.2.1 E-Cadherin

Zur Auswertung der E-Cadherin-Konzentrationen wurde die Farbintensität mit Hilfe des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS, siehe Kapitel 4.2.3) analysiert.

Nach 96 Stunden Kultivierung weist die Zelllinie der Galektin-1-gesilencenden Trophoblasttumorzellen BeWo eine signifikant höhere Expression von E-Cadherin (a), im Vergleich zu den Non-Target-gesilencenden Kontrollzellen (b) auf ($p < 0,001$).

Die Auswertung der immunzytochemischen Färbung und Signifikanz ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die immunzytochemische Färbung der membranständigen Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin wurde auch zur Bestimmung der Fusionsraten der beiden Zellreihen genutzt. Bei der Fusion der Zellmembranen bindet E-Cadherin an β -Catenin und bildet einen festen Komplex. In der immunzytochemischen Färbung wird freiliegendes, nicht als Komplex vorliegendes E-Cadherin in der Zellmembran angefärbt. Die Adhäsionsmoleküle eignen sich deshalb als indirekte Indikatoren für Fusionsprozesse. Wie in Abbildung 11 und Abbildung 12 zu sehen ist, waren nach einer Kultivierungszeit von 72 Stunden 10 % der Zellmembranen der Galektin-1 gesilencenden Zellen noch intakt. Im Vergleich dazu wiesen die Non-Target gesilencenden Zellen bereits eine deutlich höhere Fusionsrate mit nur noch 2 % stabilen Zellmembranen auf.

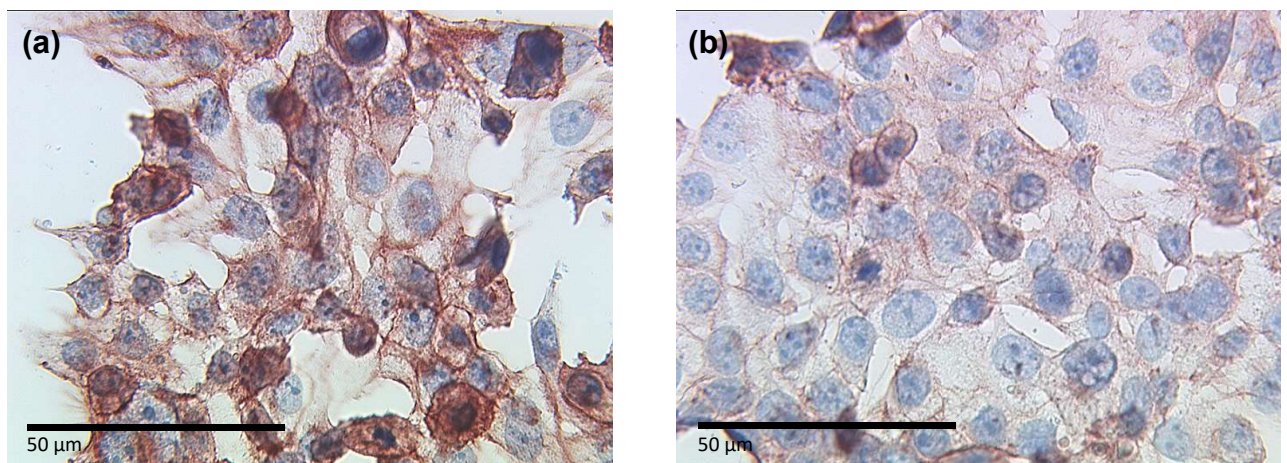


Abbildung 11: Immunzytochemische Färbung von E-Cadherin.

Die Zellen der Galektin-1-gesilencenden Zelllinie (a) wiesen eine signifikant höhere Konzentration an E-Cadherin im Vergleich zur Kontrollgruppe (b) auf.

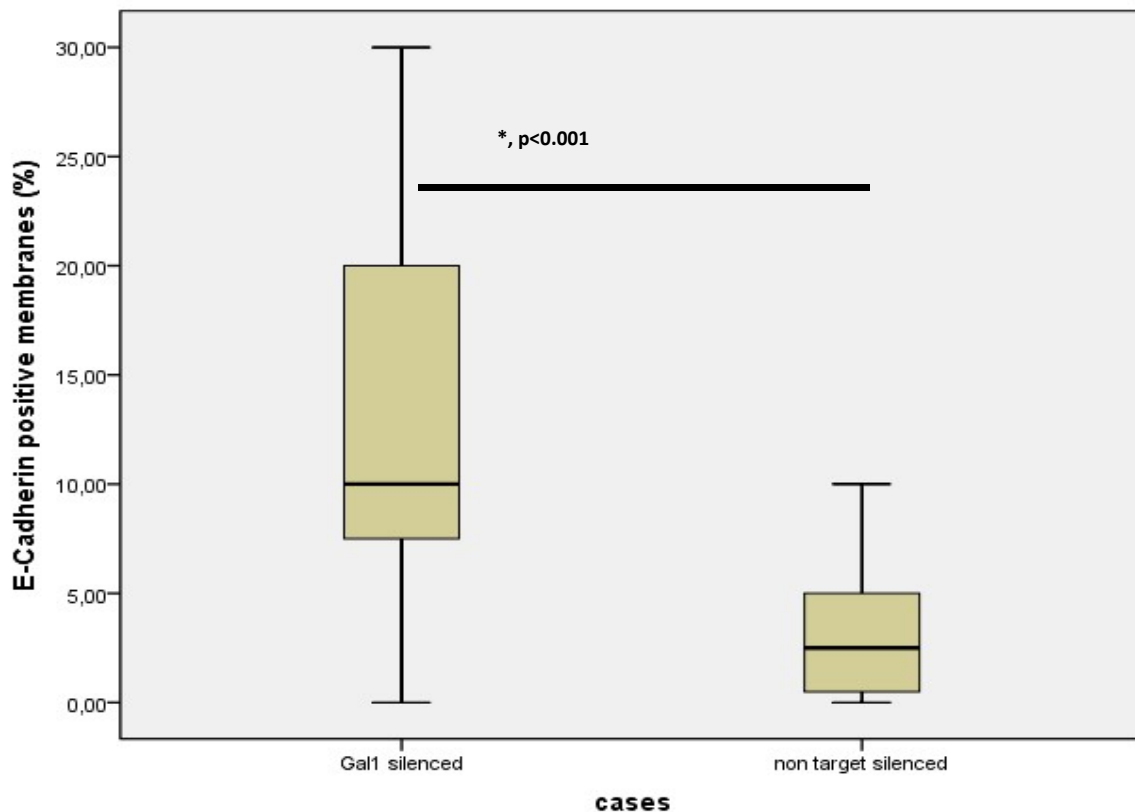


Abbildung 12: Auswertung des Fusionsverhaltens im Rahmen der immunzytochemischen Färbung von E-Cadherin.

Die Auswertung ist graphisch als Boxplot dargestellt. Die Balken des Kasten-Diagramms (Boxplot) schließen die Ergebnisse zwischen der 25. und 75. Perzentile ein, der errechnete Median ist durch die den horizontalen Balken innerhalb des Kastens gekennzeichnet. Die horizontalen Balken am Ende der Box liegen auf der fünften bzw. 95. Perzentile.

Der Nachweis von E-Cadherin gelingt in stabilen, noch nicht fusionierten Zellmembranen. Die Galektin-1-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo wiesen nach 72 Stunden Kultivierung 3,3-fach mehr stabile Zellmembranen im Vergleich zu den Non-Target-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo auf.

Die Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung ergab eine 2,6-fach höhere Konzentration an grün-fluoreszierenden E-Cadherin bei den Galektin-1 gesilenceden Zellen im Vergleich zu der Non-Target gesilenceden Kontrollgruppe. Darüber hinaus zeigte auch diese Färbung, wie in Abbildung 13 abgebildet, dass die Galektin-1 gesilenceden Zellen deutlich weniger fusionieren.

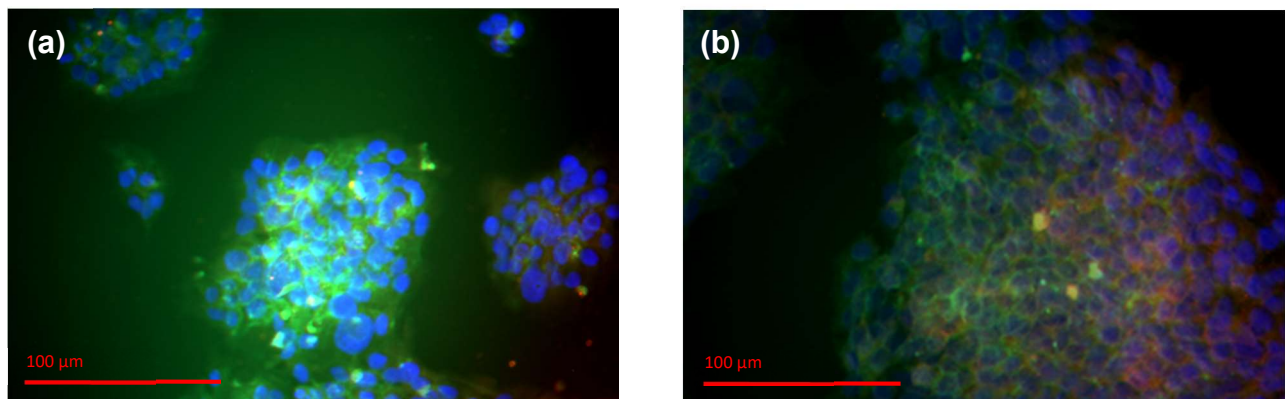


Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von E-Cadherin.

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellmembranen in Relation zur Zellzahl bestimmt. Die Auswertung ergab eine höhere Konzentration an grüngefärbten E-Cadherin in den Membranen der Galektin-1 gesilencierten Zellen (>80 %) 11 A, im Vergleich zur Kontrollgruppe (30 %) 11 B. Mikroskopische Vergrößerung: 20-fach.

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen wurden auf mRNA-Ebene durch die TaqMan®-PCR verifiziert. Die Auswertung ist in Abbildung 14 dargestellt. Im Gegensatz zum immunzytochemischen Nachweis der Proteinstruktur von E-Cadherin in der Zellmembran, zeigte sich eine erniedrigte E-Cadherin-Expression der Galektin-1-gesilencierten Zellen auf mRNA-Ebene.

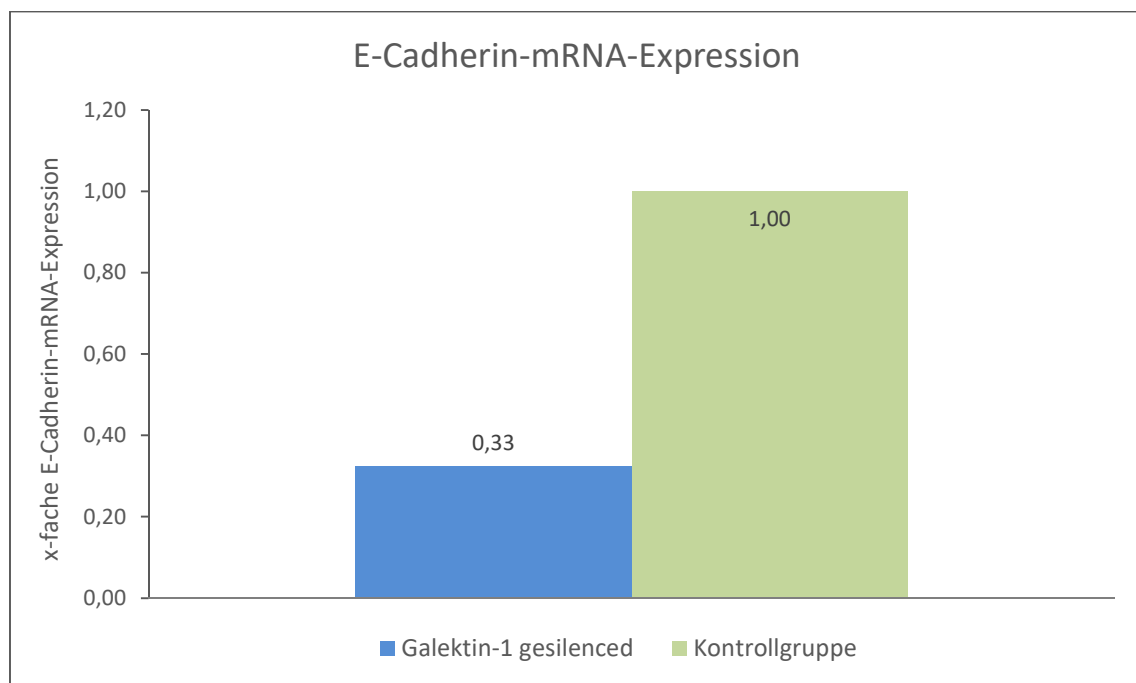


Abbildung 14: Auswertung der E-Cadherin-PCR.

Die mRNA des Adhäsionsproteins E-Cadherin wurde bei der Non-Target-gesilencierten Kontrollgruppe, die eine physiologische Konzentration an Galektin-1 hatte, um den Faktor 3,03 mehr exprimiert.

Der Standardfehler (SEM) beträgt bei den Galektin-1 gesilencierten Zellen 0,1.

6.2.2 Nachweis von β -Catenin

β -Catenin ist das zweite Adhäsionsmolekül und stellt den wichtigsten Bindungspartner für E-Cadherin dar. Auch die Konzentration von β -Catenin wurde durch immunzytochemische und doppelimmunfluoreszenzzytochemische Färbungen und anschließender Auswertung mittels des immunreaktiven Scores (IRS) untersucht. Es wurde wie beim Bindungspartner E-Cadherin (siehe Kapitel 6.2.1) auch die Stabilität der Zellmembranen, als Zeichen für Fusion, analysiert.

Die β -Catenin-Färbung (siehe Abbildung 15) wies eine höhere Expression dieses Peptids in den Galektin-1-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo auf, im Vergleich zur Non-Target-gesilenceden Kontrollgruppe. Die Unterschiede sind statistisch signifikant ($p < 0,001$). Eine grafische Darstellung der β -Catenin-Analyse wird in Abbildung 16 als Boxplot dargestellt. Durchschnittlich 20% der Galektin-1 gesilenceden Zellen waren nach 72 Stunden Kultivierung noch nicht fusioniert, da membranständiges β -Catenin in den Zellmembranen nachgewiesen werden konnte. Bei der Kontrollgruppe wiesen aufgrund der stattgefundenen Zellfusion nur 3,5% der Zellmembranen β -Catenin auf.

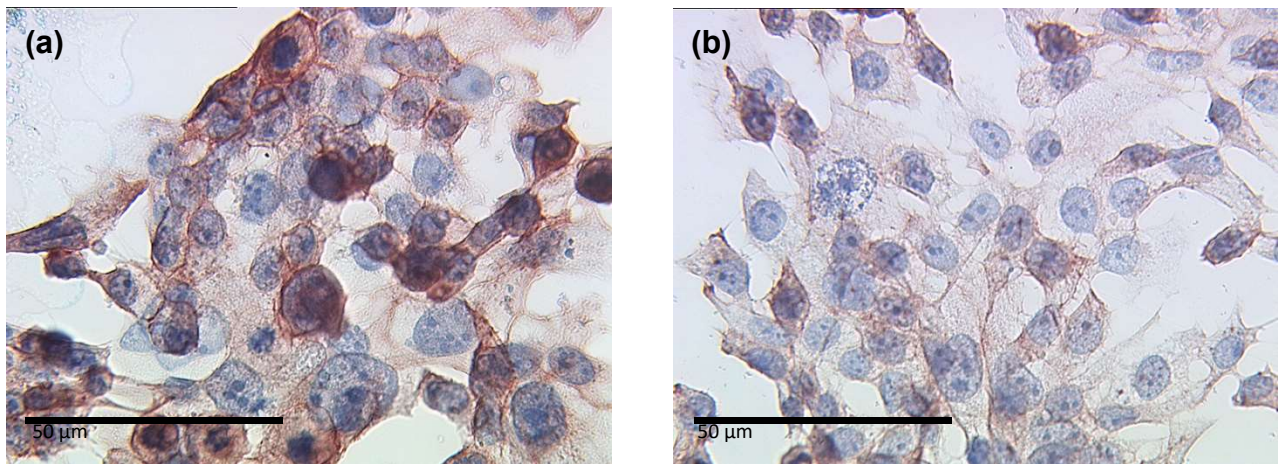


Abbildung 15: Nachweis von β -Catenin mittels immunzytochemischer Färbung.

Die Zellmembranen der Galektin-1-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo (a) wiesen eine signifikant höhere Konzentration an β -Catenin, im Vergleich zur Kontrollgruppe (b), auf.

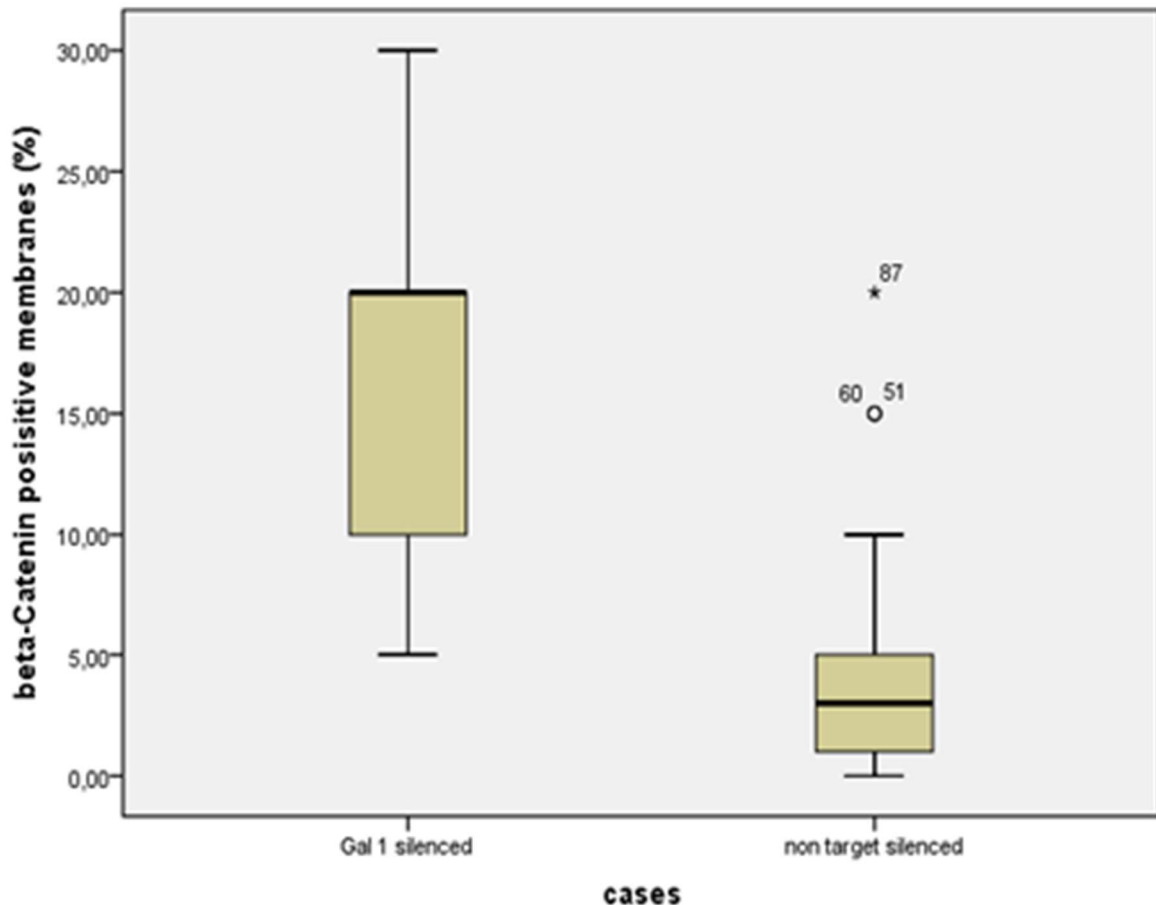


Abbildung 16: Auswertung des Fusionsverhaltens im Rahmen der immunzytochemischen Färbung von β -Catenin.

Die Kästen des Boxplot-Diagramms (Kastendiagramms) stellen die Ergebnisse zwischen der 25. und 75. Perzentile dar, der Median wird mit einem horizontalen Balken dargestellt. Die kleinen horizontalen Balken am Ende der Box zeigen die fünfte bzw. 95. Perzentile an. Ergebnisse, die die Kastenlänge 1,5 mal überschreiten werden als Kreis dargestellt, Werte die 3 mal die Kastenlänge überschreiten als Stern markiert.

Der Nachweis von β -Catenin in den Zellmembranen, ist ein Zeichen für intakte, noch nicht fusionierte Zellmembranen. Die Galektin-1 gesilenceden Zellen wiesen nach 72-stündiger Kultivierung, durchschnittlich zu 20% noch stabile Zellmembranen auf. Im Gegensatz dazu hatten über 96% der Non-Target gesilenceden Zellen neue Zellverbände gebildet.

In der Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung, wie in Abbildung 17 dargestellt, wiesen 79,13 % (SEM 2,48) der Galektin-1-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo β -Catenin in der Zellmembran auf. In der Kontrollgruppe waren es durchschnittlich 35% (SEM 2,18).

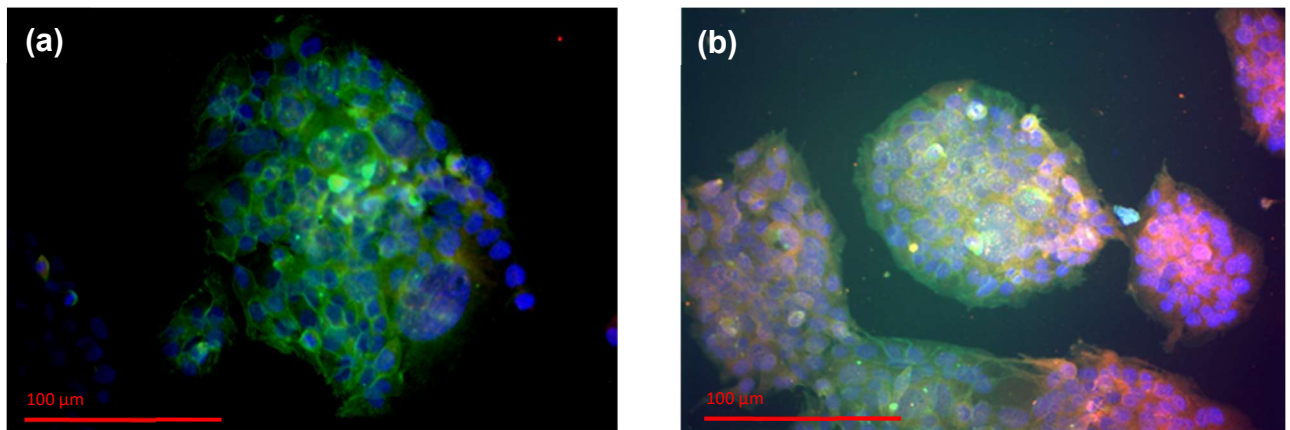


Abbildung 17: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin.

Die Zellmembranen der Galektin-1-gesilencierten Zellen A, wiesen eine höhere Konzentration an β -Catenin auf. Bei der Kontrollgruppe B war die Konzentration von β -Catenin in den Zellmembranen deutlich geringer.

(β -Catenin: grünfluoreszierend, Galektin-1: rotfluoreszierend, Vergrößerung 20-fach)

Die β -Catenin-mRNA-Expression wurde ebenfalls mit der Methode der Real-time-RT-PCR untersucht (Abbildung 18). Im Gegensatz zum Adhäsionsprotein E-Cadherin korrelierten die Ergebnisse der β -Catenin-mRNA-Expression und der β -Catenin-Proteinexpression.

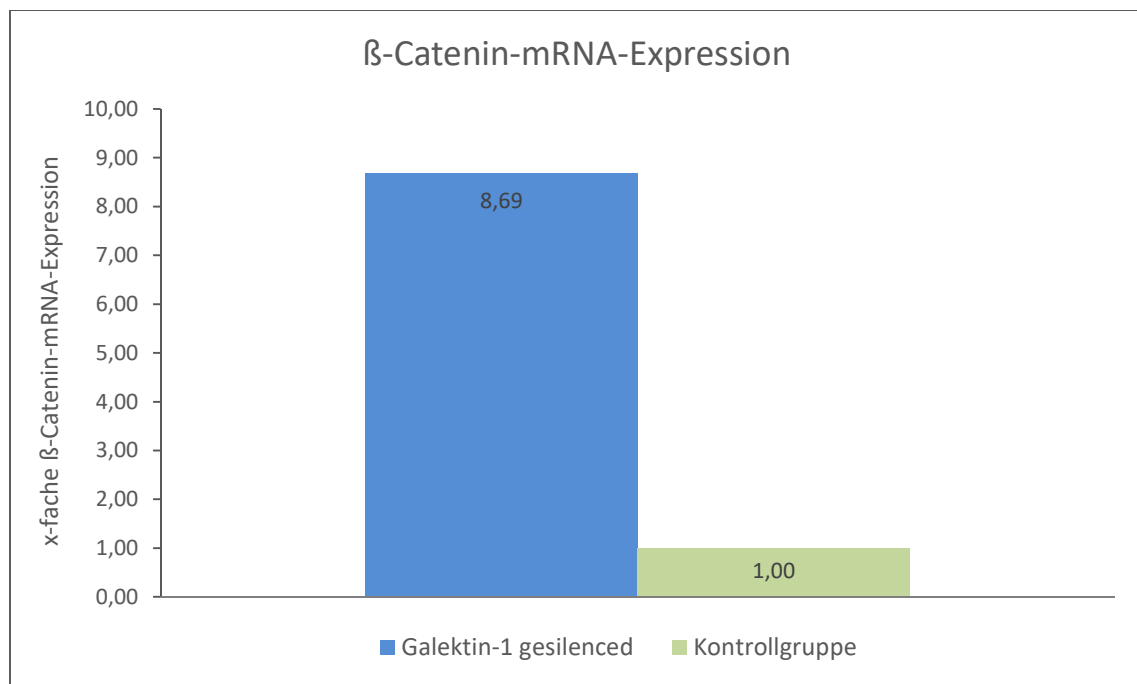


Abbildung 18: Auswertung der β -Catenin-PCR.

Die Galektin-1 gesilencierten Zellen exprimierten 0,12-fach mehr β -Catenin-mRNA als die Non-Target gesilencierte Kontrollgruppe. Der Standardfehler lag bei 4,24.

Für die β -Catenin-ELISA-Untersuchung wurden 10 Millionen Zellen für 96 Stunden kultiviert. Das Zelllysate der Galektin-1-gesilenceten Trophoblasttumorzellen BeWo wies eine signifikant höhere Expression von β -Catenin (Mittelwert $4,33 \pm 0,80$ pg/ml) auf, verglichen mit den Zellen der Kontrollgruppe (Mittelwert $2,77 \pm 0,23$ pg/ml):

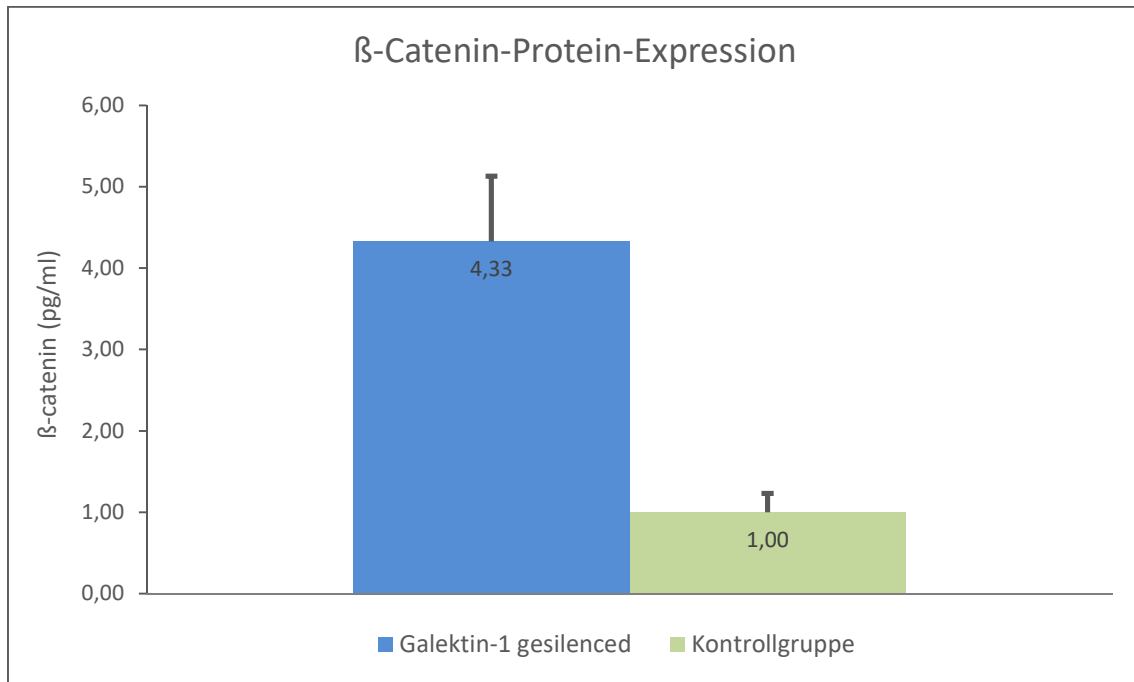


Abbildung 19: Auswertung der β -Catenin-Protein-Expression mittels ELISA.

Die Kontrollgruppe wies eine signifikant niedrigere Konzentration an β -Catenin im Vergleich zur Galektin-1 gesilenceten Zelllinie auf ($p < 0,001$).

6.3 Direkte Nachweise für Fusion

Die Zellfusion wurde nicht durch Reagenzien stimuliert, es wurde das spontane Fusionsverhalten analysiert.

Farbstoffspektralversuch

Das Prinzip des Farbstoffspektralversuchs ermöglichte es, das Fusionsverhalten von Zellen zu analysieren. Die Zellmembranen von je 250.000 Zellen beider Zellreihen, wurden mit den fluoreszierenden Farbstoffen DiO (grün) und Dil (rot) markiert. Anschließend wurden die gleiche Anzahl rot- und grün-markierter Zellen der Galektin-1 gesilenceten Zellen und der Kontrollgruppe für insgesamt 96 Stunden kultiviert (Abbildung 20). Bei den Non-Target gesilenceten Zellen bildeten sich 1,7-fach mehr

Zellverbände aus. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 21 veranschaulicht.

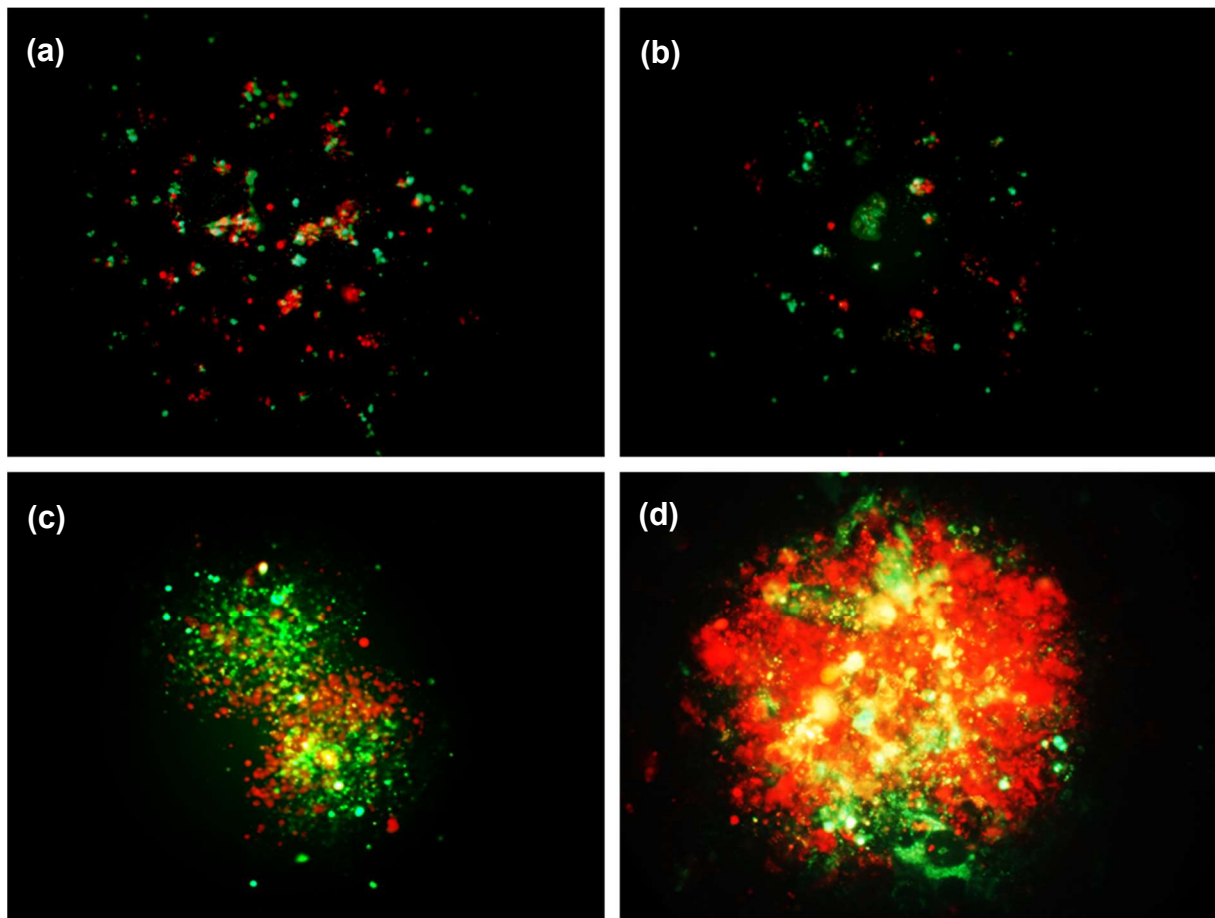


Abbildung 20: Analyse des Fusionsverhaltens mittels Farbstoffspektralversuch.

Zu Beginn des Versuchs wurde die gleiche Anzahl der Galektin-1 gesilencierten Trophoblasttumorzellen BeWo (a) und der Non-Target gesilencierte Kontrollgruppe (b) je zur Hälfte mit grün- und rot-fluoreszierenden Farbstoff markiert und anschließend zur weiteren Kultivierung zusammengeführt. Nach 96 Stunden zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Die Non-Target gesilencierten Zellen (d) bildeten große Zellverbände, die Zellmembranen fusionierten und imponierten dann gelb-fluoreszierend. Bei den Galektin-1 gesilencierten Zellen (c) fusionierten in diesem Zeitraum deutlich weniger Zellen.

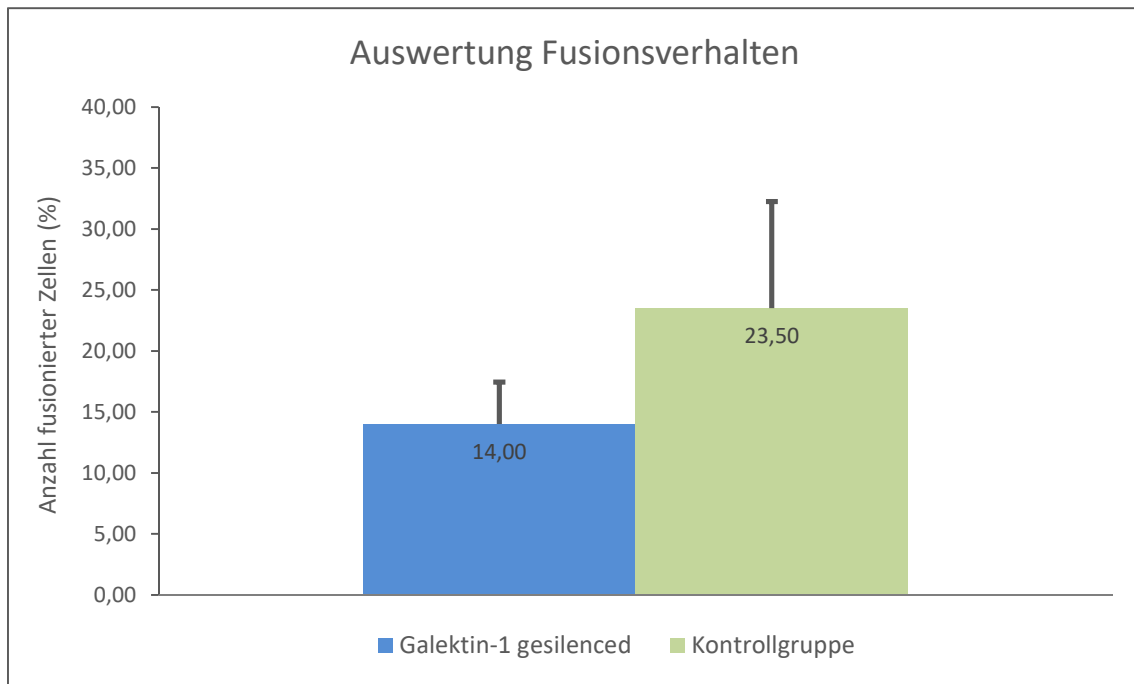


Abbildung 21: Auswertung des Fusionsverhaltens mittels Farbstoffspektralversuch.
 14% der Galektin-1 gesilenceden Zellen bildeten nach 96-stündiger Kultivierung neue Zellverbände, bei den Non-Target gesilenceden Zellen waren da bereits 23,5% der Zellen fusioniert.

Syncytin als direkter Nachweis der Synzytiumbildung

Syncytin interagiert zwischen den Trophoblastzellen und ist essentiell für deren Fusion (Blond, et al., 2000), (Than, et al., 2014). Der Nachweis von Syncytin ist ein direkter Nachweis für eine Synzytiumbildung. In der Doppelimmunfluoreszenz-Zytochemie (Abbildung 22) war die Syncytin-Protein-Expression bei den Galektin-1 gesilenceden Zellen (1-5%; SEM = 1) nach 72-stündiger Kultivierung signifikant erniedrigt, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 78% ($p = 0,011$, SEM 0,71).

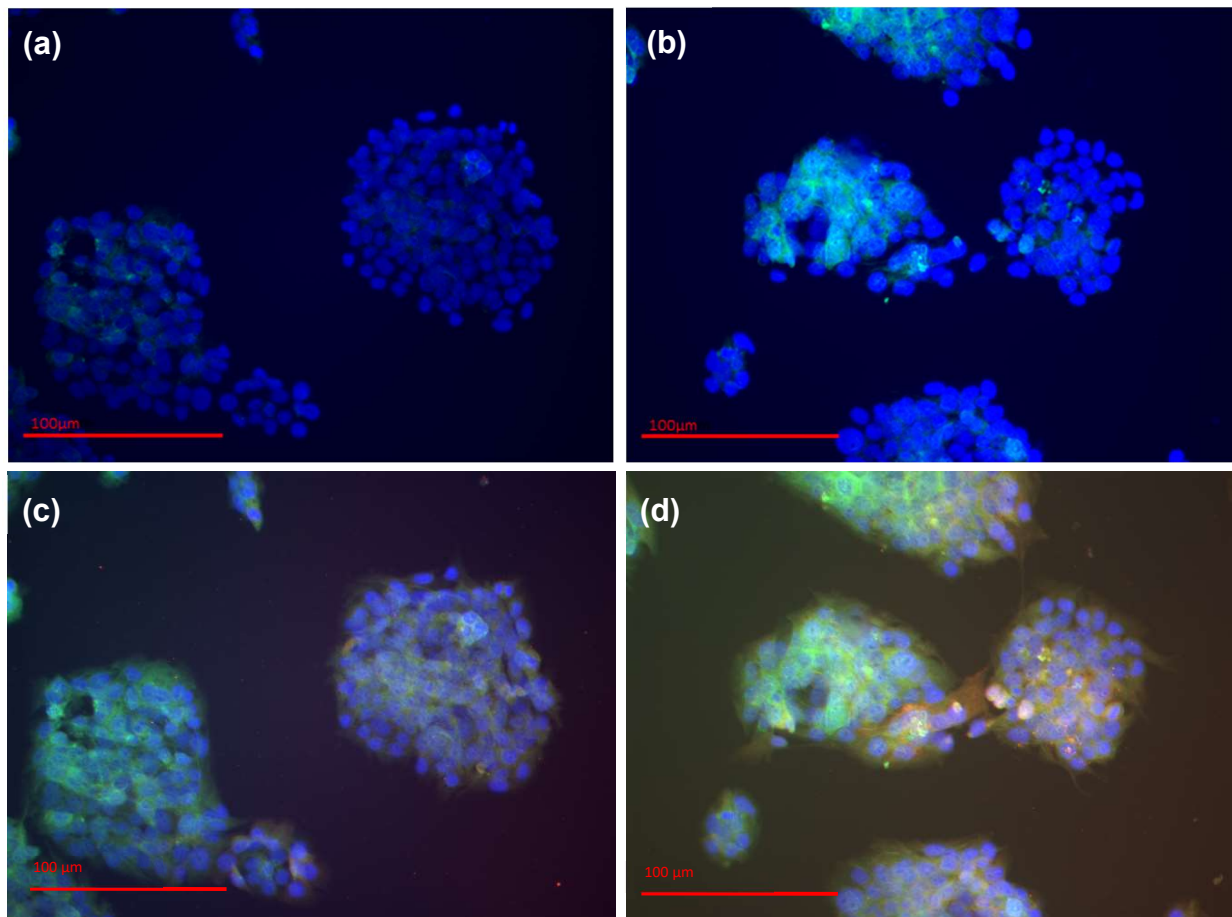


Abbildung 22: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von Syncytin;

(grünfluoreszierend), Zellkerne blaufluoreszierend, mikroskopische Vergrößerung: 20-fach. Bei den Galektin-1 gesilencierten Zellen A fusionierten nur durchschnittlich 3% der Zellen und wiesen in Folge der Synzytiumbildung Syncytin nach. Bei der Kontrollgruppe B mit einer physiologischen Konzentration an Galektin-1 fusionierten nach einer Kultivierungsdauer von 72 Stunden 78% der Zellen und wiesen Syncytin auf.

In Abbildung 22 C sind Zellen der Galektin-1 gesilencierten Zellreihe dargestellt: Galektin-1 (rotfluoreszierend), Syncytin (grünfluoreszierend) und im Vergleich die Non-Target gesilencierten Zellen D mit einer signifikant höheren Konzentration an Syncytin und Galektin-1.

Die statistische Auswertung der vier Färbereien ist in Abbildung 23 dargestellt. Nur 25% der Galektin-1 gesilencierten Zellen bildeten nach 72 Stunden einen neuen Zellverband und exprimierten Syncytin. Bei der Kontrollgruppe bildeten 75,83% der Zellen ein Synzytium und exprimierten dabei Syncytin (Abbildung 23).

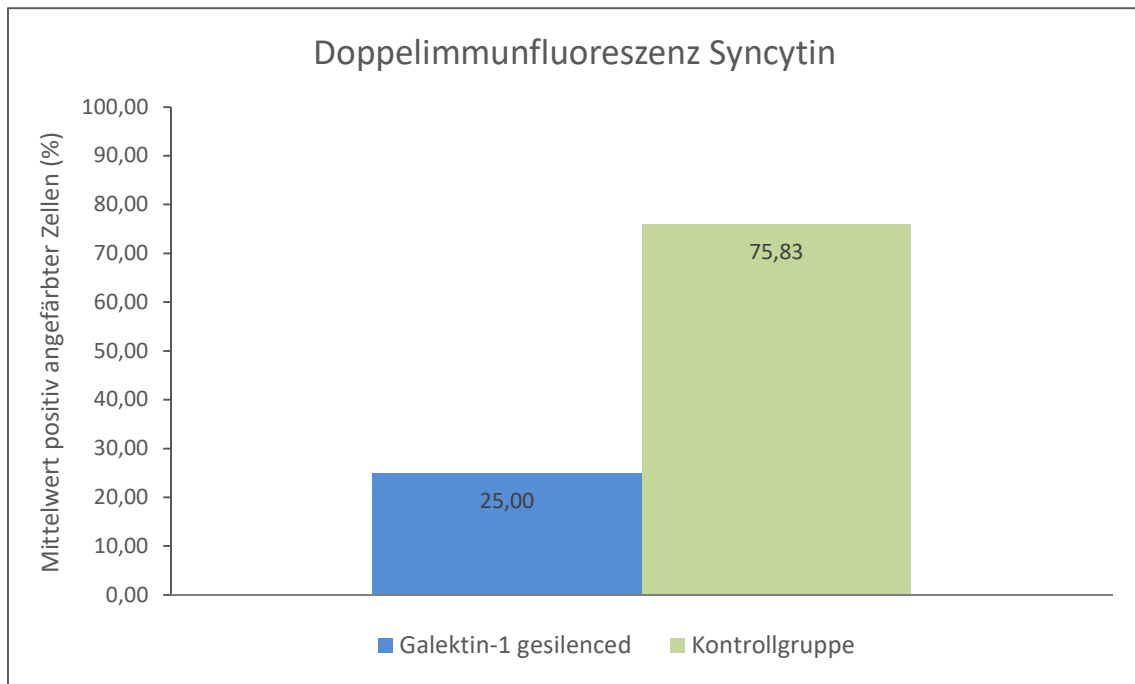


Abbildung 23: Auswertung der Syncytin-Konzentration mittels doppelimmunfluoreszenz-zytochemischen Färbungen.

Die Non-Target-gesilencede Kontrollgruppe der Trophoblasttumorzellen BeWo wies eine 3-fach höhere Konzentration an Syncytin im Vergleich zu den Galektin-1 gesilenceden Zellen auf.

Soluble E-Cadherin-ELISA

E-Cadherin wird nach der Fusion der Zellmembranen abgespalten. Dieses gelöste E-Cadherin diente zum Nachweis für Fusionsprozesse. Hierfür wurde nach 96 Stunden Kultivierung die Konzentration von gelösten E-Cadherin im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Mittels ELISA ließen sich im Zellkulturüberstand der Kontrollgruppe deutlich höhere Konzentrationen von gelöstem E-Cadherin nachweisen (Mittelwert $3,38 \pm 0,17$ pg/ml) im Vergleich zu den Galektin-1 gesilenceden Zellen (Mittelwert $1,95 \pm 0,46$ pg/ml). Die graphische Auswertung der Untersuchung ist in Abbildung 24 dargestellt.

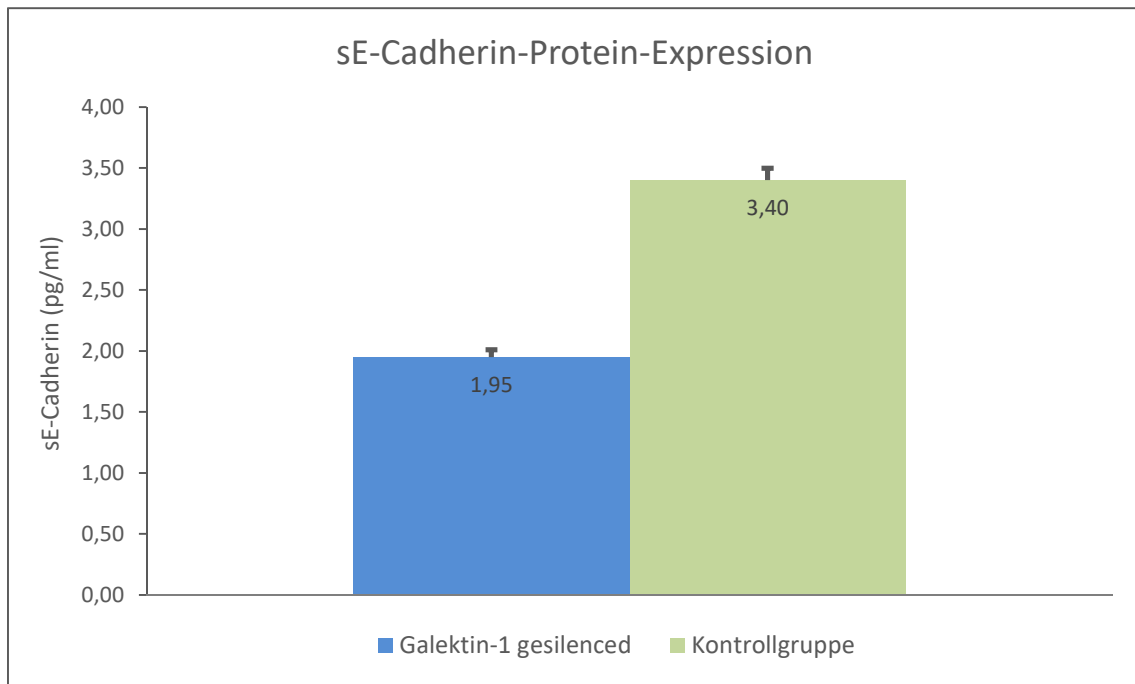


Abbildung 24: Auswertung der Konzentration des gelösten E-Cadherins (sE-Cadherin, soluble E-Cadherin) im Zellkulturüberstand von Galektin-1-gesilenceder Trophoblasttumorzellen und der Non-Target-gesilenceden Kontrollgruppe.

Bei den Galektin-1 gesilenceden Zellen war die Konzentration von sE-Cadherin, nach 96-stündiger Kultivierung, um den Faktor 1,7 erniedrigt, aufgrund der geringeren Synzytiumbildung ($p < 0,001$).

7 Diskussion

Aus vorhergehenden Arbeiten ist die stimulierende Wirkung auf die Synzytiumbildung von Trophoblasttumorzellen BeWo durch Galektin-1 bekannt (Kolundzic, et al., 2011), (Fischer, et al., 2011). Im Umkehrschluss stellte sich nun die Frage, ob beim Fehlen von Galektin-1 die Synzytiumbildung gehemmt bzw. möglich ist.

Die Fusion der Trophoblastzellen zum Synzytium ist der initiale Prozess der Plazentaentwicklung und somit die Grundlage jeder Schwangerschaft. Bei Störungen der Synzytiumbildung kommt es zu Schwangerschaftspathologien bis hin zum Abort (HumanEmbryology13), (Schneider, et al., 2006). Galektin-1 nimmt als immunmodulatorisches Protein Einfluss auf die Physiologie und Pathologie von Schwangerschaften (Walzel, et al., 1995), (Markert, et al., 2017). Bei Frauen mit wiederholten Aborten konnte eine erniedrigte Galektin-1-Konzentration festgestellt werden. Deshalb ist die Klärung der Frage nach den Auswirkungen eines Galektin-1-Mangels von immenser Bedeutung: Wie beeinflusst der Mangel an Galektin-1 die Synzytiumbildung, den elementaren Teil der Schwangerschaft?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung diente ein etabliertes Trophoblast-Zellmodell. In den letzten vier Jahrzehnten wurden BeWo-, JEG-3- und JAR-Zelllinien als Standardzellkultur genutzt, um Funktion und Differenzierung von humanen Trophoblastzellen zu untersuchen. Alle drei Zelllinien entstammen einem Chorionkarzinom (Soares, et al., 2006). In dieser Arbeit wurden BeWo-Zellen verwendet. In vorausgehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hat sich diese Zelllinie als Trophoblast-Zellmodell bereits bewährt (Jeschke, et al., 2006), (Fischer, et al., 2010), (Fischer, et al., 2011), (Hutter, et al., 2016).

Die Trophoblasttumorzellen BeWo können jedoch nicht unmittelbar mit physiologischen Trophoblastzellen verglichen werden. Beispielsweise zeichnen sich die Trophoblasttumorzellen durch eine höhere Galektin-1-Expression aus und weisen möglicherweise dadurch eine höhere Proliferation auf (Lala, et al., 2002), (Ezashi, et al., 2012), (Vicovac, et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell angepasst: Zellen dieser Zelllinie wurden genetisch verändert mit dem Ziel, die Synzytiumbildung von Galektin-1-freien Trophoblastzellen zu untersuchen. Hierfür wurden die Zelllinien dem Verfahren des

Silencings unterzogen, wobei Galektin-1 bzw. eine nicht kodierende Region bei der Kontrollgruppe auf dem Genom blockiert wurde. Im Fokus standen die Galektin-1-gesilenceden Trophoblasttumorzellen BeWo, als Kontrollgruppe dienten Non-Target-gesilencede Trophoblasttumorzellen BeWo mit unveränderter Galektin-1-Expression.

Das stabile Galektin-1-Silencing gelang dem Hersteller der gesilenceden BeWo-Zelllinien zunächst nicht. Für die ersten Versuchsreihen standen uns nur transient gesilencede Zellen (*transient silenced BeWo*) zur Verfügung. Diese Zellen wiesen eine signifikante Galektin-1-Knockdown-Quote von 70 % in den ersten 72 Stunden auf. Anschließend nahm die Konzentration an Galektin-1 wieder zu. Der Versuchszeitraum von drei Tagen war zur Kultivierung, für parallele Versuche und die Verlaufsbeobachtung zu gering. Auch die Knockdown-Quote von nur 70 % stellte die Validität der Ergebnisse in Frage.

Nach vielen Silencing-Versuchsreihen gelang es dem Hersteller der genetisch veränderten Zelllinien *Sirion Biotech* erstmals, Zellen mit einer stabilen Knockdown-Quote von 99% herzustellen. Es gelang jedoch nicht, vitale, vollständig Galektin-1-freie Zellen herzustellen. Dies lässt vermuten, dass Galektin-1 essentiell für die Trophoblasttumorzellen ist.

Alle Untersuchungen wurden mit den stabil gesilenceden Zellen (*stabil silenced BeWo*) wiederholt. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Fusionsverhalten der beiden Zelllinien: Die Non-Target-gesilencede Kontrollgruppe mit einer physiologischen Konzentration an Galektin-1 wies im Durchschnitt eine dreifach höhere Fusionsrate als die Galektin-1-gesilenceden Zellen auf. Der direkte Nachweis der Zellfusion gelang durch einen Farbstoffspektralversuch: Die Zellen wurden je zur Hälfte mit rot- bzw. grün-fluoreszierenden Farbstoffen markiert, nach der Fusion fluoreszierten die Zellverbände gelb. Des Weiteren ermöglichten immunzytochemische Färbereien der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin die Auswertung stabiler Zellmembranen. Es zeigte sich, dass Galektin-1 einen direkten Einfluss auf den Fusionsprozess von Trophoblasttumorzellen BeWo hat (Hutter, et al., 2016).

Als ein direkter Marker für eine *de novo* Synzytiumbildung diente das Protein Syncytin, welches für die Synzytiumbildung erforderlich ist (Malassiné, et al., 2005). Im menschlichen Organismus wirkt Syncytin bei der Plazentogenese als Mediator

zwischen Trophoblastzellen (Than, et al., 2014). Niedrige Syncytinkonzentrationen wurden bei Schwangerschaftspathologien wie HELLP, PE oder IUGR festgestellt (Langbein, et al., 2008). In vorausgehenden Studien konnte bewiesen werden, dass die Syncytinexpression nach der Stimulation mit Galektin-1 gesteigert ist (Fischer, et al., 2010). Diese Ergebnisse werden durch diese Arbeit bestätigt, denn die Galektin-1-gesilenceten Zellen weisen eine signifikant niedrigere Expression von Syncytin, im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Syncytinexpression und somit die Syncytiumbildung scheint direkt von der Galektin-1-Kontraktion anhängig zu sein.

Für den unmittelbaren Fusionsprozess der Trophoblastzellen zum Zellverband sind die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin verantwortlich. Sie bilden einen E-Cadherin- β -Catenin-Komplex aus und verankern die Zellmembranen miteinander (El-Bahrawy, et al., 1998), (Schmitz, 1. Auflage, 2007). Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Galektin-1 auf die für den Fusionsprozess essentiellen Adhäsionsmoleküle zu untersuchen. Die Galektin-1-gesilenceten Zellen wiesen nach 72-Stunden Kultivierung durchschnittlich eine 3,8-fach höhere Konzentration von E-Cadherin auf. Dies wurde mittels immun- und doppelimmunfluoreszenzzytochemischen Färbungen untersucht. Mittels PCR fiel jedoch auf, dass die Non-Target-gesilenceten Zellen eine dreimal höhere E-Cadherin-mRNA-Expression hatten, als die Galektin-1-gesilenceten Zellen. Ein Zusammenhang zwischen der Menge an fusionsfähigen Trophoblastzellen, der E-Cadherin-Konzentration und der E-Cadherin-Genexpression als dynamischer Prozess, wurde bereits 1991 von Coutifaris et al. beschrieben. Eine transkriptionelle Regulation wird diskutiert, der molekulare Mechanismus ist bisher jedoch unklar (Coutifaris, et al., 1991), (Gerbaud, et al., 2015). Zur weiteren Objektivierung der Ergebnisse erfolgte der Nachweis von gelöstem, d.h. nach der Fusion abgespaltenem E-Cadherin im Zellkulturüberstand, mittels ELISA. Die Ergebnisse korrelierten mit den Auswertungen der Immunzytochemie.

Für unseren Organismus ist E-Cadherin existentiell. Es kann bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung in Blastomeren nachgewiesen werden, im weiteren Verlauf wird E-Cadherin in allen Epithelien exprimiert. Studien mit E-Cadherin-Knock-out-Mäusen zeigten, dass Embryonen im Stadium der Blastozyste abstarben. Dies ließ den Schluss zu, dass „die Abwesenheit von E-Cadherin mit dem Leben nicht vereinbar ist“ (Larue, et al., 1994), (Kan, et al., 2007). E-Cadherin hat als Adhäsionsprotein eine zentrale Rolle bei der Regulation von Zellverbänden und könnte somit eine

Schlüsselrolle bei der Induktion der Fusion von Trophoblastzellen einnehmen. Die regulierende Funktion von E-Cadherin ist bisher in der Epidermis gut erforscht. Dort sorgt E-Cadherin für einen geregelten Zellverband mit einem Gleichgewicht zwischen Keratinozyten und Melanozyten. Bei fehlender E-Cadherin-Expression entfällt ein regulierender Einfluss auf die Keratinozyten. Veränderte Melanozyten können unkontrolliert wachsen. E-Cadherin hat hier die Funktion eines Tumorsuppressors. Denn in Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Reexpression von E-Cadherin in Melanomzellen - dies gelingt z.B. durch die Transfektion eines E-Cadherin-Expressionsplasmids - das Tumorstadium *in vivo* gestoppt werden konnte (Poser, et al., 2001) (Hsu, et al., 2000). Den Einfluss von E-Cadherin auf eine gesunde Schwangerschaft zeigt eine neuere Studie: Es wurde nachgewiesen, dass die Präeklampsie als eine häufige Schwangerschaftspathologie mit einer erhöhten E-Cadherin-Expression assoziiert ist (Li, et al., 2014).

Galektin-1 ist für die *in-vitro*-Einwanderung von Trophoblastzellen essentiell. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Galektin-1-Konzentration und der Trophoblasteninvasion. Dies wurde in Versuchen mit humanen Trophoblastzellen, die mit rekombinantem Galektin-1 behandelt wurden bzw. das endogene Galektin-1 mittels Antikörper blockiert wurde, nachgewiesen (Kolundzic, et al., 2011). In den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich ein Mangel an Galektin-1 als negativer Prädiktor für Schwangerschaften. Jedoch weiß man, dass eine erhöhte Konzentration an Galektin-1 ebenfalls einen Risikofaktor für Schwangerschaftspathologien darstellt. Bei Schwangeren mit Präeklampsie, HELLP und Gestationsdiabetes wurde eine erhöhte Galektin-1-Konzentration im Serum und Plazentagewebe nachgewiesen (Hutter, et al., 2016), (Schnabel, et al., 2016), (Barrientos, et al., 2014), (Eckart, et al., 2014), (Jeschke, et al., 2007). Blasenmolen, Trophoblastentumoren und Chorionkarzinome sind ebenfalls mit erhöhten Galektin-1-Expression assoziiert (Bozic, et al., 2004).

Die richtige Konzentration von Galektin-1 scheint somit entscheidend für eine gesunde Schwangerschaft zu sein. In dieser Arbeit konnte erneut bewiesen werden, dass sich das Fusionsverhalten von Trophoblasttumorzellen BeWo durch Galektin-1 direkt beeinflussen lässt. Durch eine deutlich erniedrigte Galektin-1-Expression war die Synzytiumbildung stark vermindert. In vorhergehenden Arbeiten konnte die Fusion der Trophoblasttumorzellen durch die Stimulation mit Galektin-1 gesteigert werden

(Fischer, et al., 2010). Da Aborte oft mit einer erniedrigten Galektin-1-Konzentration einhergehen, stellt sich die Frage, ob man Galektin-1 nicht therapeutisch nutzen kann. Erste tierexperimentelle Ansätze, Galektin-1 therapeutisch einzusetzen, waren erfolgreich. Mäuse, die mit Galektin-1 therapiert wurden, wiesen eine erniedrigte Abortrate auf. Dies könnte ein potentieller Behandlungsansatz bei Risikopatientinnen in der Frühschwangerschaft sein (Blois, et al., 2007). Auf der anderen Seite wissen wir heute schon um die Gefahren zu hoher Galektin-1-Konzentrationen. Sie treten im Rahmen von Schwangerschaftspathologien auf, auch Tumorerkrankungen wie das Chorionkarzinom und die Blasenmole werden mit erhöhten Galektin-1-Konzentrationen assoziiert.

Diese *in-vitro*-Studie ist natürlich nur eingeschränkt auf die natürliche Plazentation übertragbar. Es muss in der Zukunft sicher erst ein Normwert der Galektin-1-Konzentration in Abhängigkeit der Schwangerschaftswoche definiert werden. Einen guten erfolgsversprechenden Ansatz stellt die Forderung nach der Galektin-1-Bestimmung im Serum schwangerer Frauen im Rahmen des Ersttrimesterscreenings dar. In Zukunft müssen zuerst tierexperimentelle Erfahrungen mit dem pharmazeutischen Nutzen von Galektin-1 gesammelt werden, um in ferner Zukunft Therapieansätze für Risikoschwangerschaften entwickeln zu können.

Die Untersuchung immunologischer Prozesse während der Schwangerschaft, auf die auch Galektin-1 einen großen Einfluss hat, steht vor allem im Fokus der Reproduktionsmedizin. Weitere Kenntnisse über die zelluläre Immunität bei Eizell- und Embryonenspenden könnten die Erfolge der Reproduktionsmedizin verbessern. Die neuen Erkenntnisse sind auch für weitere medizinische Fachgebiete, wie zum Beispiel die Transplantationsmedizin von Interesse, da es sich bei einem Feten um ein allogenes Transplantat handelt (Vattai, et al., 2017).

Diverse Therapieoptionen scheinen im Knockdown von Galektin-1 zu liegen: In aktuellen Studien wird zunehmend die Auswirkung des Galektin-1-Silencings untersucht. In einer Studie wurde Galektin-1 in einem Mausmodell *in vivo* gesilenced. Zur Untersuchung der aberranten retinalen Neovaskularisation als Folge einer Sauerstoff-induzierten Ischämie, wurde adenovirale Galektin-1-RNA intravitreal injiziert. Daraufhin war die retinale Neovaskularisation signifikant schwächer ausgeprägt. Aus dieser Studie wurde der Schluss gezogen, dass bei einer retinalen

Hypoxie Galektin-1 vermehrt exprimiert wird und somit für die Gefäßeinsprossung verantwortlich ist. Ziel dieser Studie ist es, zukünftig eine Therapie für die diabetische Retinopathie bzw. die Retinopathie des Frühgeborenen zu entwickeln (Yang, et al., 2017).

Auch in einer onkologischen Studie wurde Galektin-1 gesilenced. Der Regulationsmechanismus von Galektin-1 auf die multidrug-Resistenz, also die Resistenz gegen Chemotherapeutika, von Brustkrebszellen ist noch unklar. Aber einer Studie gelang der Nachweis, dass die multidrug-resistenten Brustkrebszellen nach dem *in-vitro*-Knockdown von Galektin-1 sensitiver für die Therapie zweier Chemotherapeutika waren (Wang, et al., 2017).

Diese Beispiele verdeutlichen, welch großes Potential insbesondere im Silencing dieses Proteins liegt. In Zukunft werden weitere Untersuchungen an *in-vivo*-Modellen notwendig sein, um zeitnah therapeutische Nutzen aus der Galektin-1-Forschung ziehen zu können.

8 Zusammenfassung

Galektin-1 ist Gegenstand der Wissenschaft seit seiner Entdeckung 1975. Abhängig vom Gewebe ist die Funktion dieses Oberflächenproteins sehr unterschiedlich: Zum einen kann es die Fusion und Proliferation von Zellen fördern, zum anderen die Apoptose einleiten. In Studien der letzten Jahre zeigte sich immer mehr die immunmodulatorische Funktion von Galektin-1, die insbesondere die Ausbildung der fetomaternalen Toleranz zu Beginn der Schwangerschaft induziert. Aborte und Schwangerschaftspathologien stehen in Zusammenhang mit veränderten Galektin-1-Konzentrationen im Serum und in der Plazenta.

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen eines Galektin-1-Mangels auf die Fusion von Trophoblastzellen zum Synzytium zu untersuchen. Die Synzytiumbildung ist der fundamentale Schritt der Plazentation zu Beginn einer Schwangerschaft.

Die Untersuchungen führten wir an einem etablierten Zellmodell für Trophoblastzellen, den Trophoblasttumorzellen BeWo durch. Zur Untersuchung verwendeten wir genetisch veränderte Zelllinien der Trophoblasttumorzellen BeWo. Das Genom der Zellen wurde in einigen Sequenzen verändert. Im Fokus stand die Zelllinie, bei der Galektin-1 auf dem Genom blockiert wurde (Galektin-1-silenced). Die Kontrollzelllinie wurde auch dem Verfahren des *Silencings* unterzogen. Allerdings war hier eine DNA-Sequenz ohne Funktion blockiert (Non-Target-silenced). Diese Zellen exprimierten Galektin-1 in physiologischen Mengen.

Die Galektin-1-Konzentration und das Fusionsverhalten wurden mittels Immunzytochemie, Doppelimmunfluoreszenz, PCR und ELISA analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss der Galektin-1-Konzentration auf die für die Fusion essentiellen Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und β -Catenin, und das Protein Syncytin mittels Immunzytochemie, ELISA und PCR untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass Galektin-1 einen unmittelbaren Einfluss auf die Zellfusion hat. Die Zellen der Non-Target-gesilenceden Kontrollgruppe wiesen eine dreifach höhere Fusionsrate, im Vergleich zu den Galektin-1 gesilenceden Zellen auf. Auch die Syncytinexpression der Galektin-1-gesilenceden Zellen war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Das Protein Syncytin wird bei der Synzytiumbildung von Trophoblastzellen exprimiert. In dieser Arbeit wurde die regulierende Funktion von

E-Cadherin deutlich. Es zeigte sich, dass die E-Cadherin-Konzentration in der Zellmembran nach der Fusion abnimmt und somit die Non-Target-gesilenceden Zellen eine geringere Konzentration aufwiesen. Die E-Cadherin-mRNA-Expression war jedoch signifikant erhöht. Dies könnte im Rahmen einer transkriptionellen Regulation erfolgen. Die Studie zeigte, dass eine erniedrigte Galektin-1-Expression einen hemmenden und somit negativen Einfluss auf den Fusionsprozess von Trophoblastzellen, die Synzytiumbildung hat.

Das wissenschaftliche Interesse der Galektin-Forschung gilt in den letzten Jahren zunehmend der therapeutischen Anwendung: Es gibt die Vision, dieses Protein in Zukunft auch therapeutisch einsetzen zu können: bei Tumorerkrankungen, zur Immunmodulation und bei Schwangerschaftspathologien. Dafür müssen Einfluss und Funktion dieses Proteins jedoch noch besser verstanden werden.

9 Firmenverzeichnis

Firma	Firmensitz
Abanova	Taipei City, Taiwan
Applied Biosystems	Foster City, USA
B. Braun	Melsungen, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Calbiochem	Beeston Nottingham, UK
Canon Inc.	Tokio, Japan
Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Dako	Glostrup, Dänemark
Diagnostic BioSystems	Pleasanton, USA
Dianova	Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon Becton Dickinson Labware	New Jersey, USA
GE Healthcare	Braunschweig, Deutschland
Greiner Bio-One	Frickhausen,, Deutschland
Jackson Immunoresearch	Baltimore, USA
Labvision	Fremont, USA
Leitz	Wetzlar, Deutschland
Liebherr	Biberach an der Riss, Deutschland
Macherey-Nagel,	Düren, Deutschland
Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, USA
Ray Biotech	Norcross, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Firma	Firmensitz
Scien Cell	San Diego, USA
Siemens	München, Deutschland
Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Sirion Biotech	Martensried, Deutschland
Sommerschmied	Appen, Deutschland
SPSS Inc.	Chicago, USA
Uniequipe	Planegg, Deutschland
Vector Laboratories	Burlingame, USA

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Mein erster und ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke für die überaus hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die konstruktive Anleitung, die Unterstützung bei meinen Publikationen und die motivierenden Gespräche.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Christiana Kuhn, Simone Hofmann und Irmgard Wiest, die mir stets mit hilfreichen Tipps zur Seite standen und meine Fragen immer kompetent beantworteten. Auch ihre unermüdliche Geduld mich in die Methoden und die Versuche einzuführen seien hier noch mal besonders betont. Vielen Dank, dass ich so liebevoll in euren Kreis aufgenommen wurde und für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Für ihr außerordentlich sorgfältiges Korrekturlesen, die sehr gute kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung während Laborzeit möchte ich Frau Dr. Aurelia Vattai herzlich danken. Auch meiner Mitdotorandin Frau Dr. Gabriela Leuschner möchte ich für die gute Zusammenarbeit herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Marius, der mir über meine Motivationstiefs hinweggeholfen hat, mich ständig neu anspornte, mich bei allen Belangen unterstütze und immer für mich da war.

An letzter Stelle, aber gewiss nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern Johanna und Wolfgang Tschakert. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir in jeder Situation eine unschätzbar große Hilfe seid.

11 Veröffentlichungen/ Kongress-Teilnahmen

- Juni 2010: Posterpräsentation am 84. Bayerischen Gynäkologentag 2010 in
Erlangen
- Oktober 2010: Vortrag am 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für
Gynäkologie und Geburtshilfe in München
- November 2010: Posterpräsentation am 8. Europäischen Kongress für
Reproduktionsmedizin (European Congress on Reproductive
Immunology/ ESRI) in München
- September 2015: Publikation, Cell Adhg Migr. „Gal-1 silenced trophoblast tumor cells
(BeWo) show decreased syncytium formation and different miRNA
production compared to non-target silenced BeWo cells.“, Hutter, S.;
Morales-Prieto, D.M.; Andergassen, U.; Tschakert, L.; Kuhn, C.;
Hoffman, S.; Markert, U.R.; Jeschke, U.

12 Lebenslauf

13 Literaturverzeichnis

Al-Ansari S. [et al.] Galectins in atherosclerotic disease [Artikel] // Trends Cardiovasc. Med.. - [s.l.] : Elsevier, 2009. - 19(5): 164-9. - <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1050173809001546-gr1.jpg>.

Alberts [et al.] Molekularbiologie der Zelle [Buchabschnitt]. - Weinheim : Wiley-VHC Verlag & Co. KGaA, 5. Auflage, 2011.

Ambrosius Herwart und Lupp Hans Immunhistochemie, Grundlagen und Techniken [Buchabschnitt]. - Berlin : Akademie-Verlag Berlin, 1. Auflage, 1987.

Barondes S.H. [et al.] Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. [Journal]. - [s.l.] : Development, 1994. - 120(6): 1373-84.

Barondes Samuel H., Castronovo Vincent und al. et Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins [Artikel] // Cell. - 1994. - Vol. 76(4); 597-598.

Barondes SH Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. [Artikel] // Trends Biochem. Sci.. - 1988. - 13: 480-482.

Barrientos G. [et al.] Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future [Journal]. - 2014. - 20(2):175-93. doi: 10.1093/humupd/dmt040. Epub 2013 Sep 27. : Bd. Hum Reprod Update..

Beer AE. und Quebbeman JF. Immunological mechanisms of survival and "rejection" of the fetal allograft. [Artikel] // Mead Johnson Symp Perinat Dev Med. - 1986. - Bde. (24): 20-6.

Bender H. und Dall P. 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe [Buch]. - Düsseldorf : Springer, 2002.

Bergemann C [et al.] Stimulation of hCG protein and mRNA levels in trophoblast tumour cells Jeg3 and BeWo by glycodeclin [Artikel] // Anticancer Research. - 2003. - 23(2A): p. 1107-13.

Blois S. M., Ilarregui J. M. und al. et A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance [Artikel] // Nature Medicine. - 2007. - 13(12); 1450-1457.

Blois Sandra M. et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. [Artikel] // Nature Medicine. - 2007.

Blond JL. [et al.] An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor [Artikel] // J Virol.. - 2000. - 747(7):3321-3329.

Boller K., Vestweber D. und Kemler R. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. [Artikel] // J. Cell. Biol.. - 1985. - 100(1): 327-32.

Bopp T. und Klein M. RNA-interference [Buchabschnitt] // Genetische Methoden. - Heidelberg : Spektrum, 2012. - Bd. 5. Auflage.

Boyd W. und Shapleigh E. Antigenic Relations of Blood Group Antigens as Suggested by Tests with Lectins [Artikel] // The Journal of Immunology. - 1954. - Vol. 73, No. 4 226-231.

Bozic M. [et al.] Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. [Artikel] // Placenta. - 2004. - 25(10):797-802.

Brazowski E. [et al.] Galectin-3 expression in pouchitis in patients with ulcerative colitis who underwent ileal pouch-anal anastomosis (IPAA). [Journal]. - [s.l.] : Pathol Res Pract, 2009. - Bde. 205(8): 551-8.

Brembeck F.H., Rosário M. und Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. [Artikel] // Curr. Opin. Genet. Dev.. - [s.l.] : Elsevier, 2006. - 16(1): 51-9.

Brown T. A. Genome und Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik [Buchabschnitt]. - Heidelberg : Springer-Verlag, 3. Auflage, 2007.

Bühling Kai und Freidmann Wolfgang Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe [Buch]. - München : ELSEVIER - Urban und Fischer, 2. Auflage, 2009.

Bulmer J.N. und Williams P.J. Lash, G.E. Immune cells in the placental bed. [Journal]. - [s.l.] : Int J Dev Biol, 2010. - 54(2-3): 281-294.

Camby I. [et al.] Galectin-1: a small protein with major functions. [Journal]. - 2006. - 16(11):137R-157R. Epub 2006 Jul 13. : Bd. Glycobiology..

Cho M. und Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. [Artikel] // J. Biol. Chem.. - 1995. - 270(10): 5198-206.

Choe YS. [et al.] Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. [Journal]. - 1997. - 48(2):261-6. : Bd. Mol Reprod Dev..

Clark D.P. und Pazdernik N.J. Molekulare Biotechnologie, Grundlagen und Anwendungen [Buch]. - Heidelberg : Spektrum, 2009.

Conacci-Sorrell M. und Zhurinsky J. Ben-Ze'ev, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. [Artikel] // J. Clin. Invest.. - 2002. - 109(8): 987-991.

Cook GM Glycobiology of the cell surface: the emergence of sugars as an important feature of the cell periphery. [Artikel] // Glycobiology. - [s.l.] : Oxford Journals, 1995. - 5(5): 449-58.

Cooper D.N. und Barondes S.H. God must love galectins: he made so many of them. [Artikel] // Glycobiology. - 1999. - 9(10): 979-84.

Coutifaris C. [et al.] E-Cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. [Artikel] // Development.. - 1991. - 113(3):767-77.

Deák M. [et al.] Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. [Journal]. - 2015. - 220(4):483-9. doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.023. Epub 2014 Oct 30. : Bd. Immunobiology.

Demers M. [et al.] Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. [Artikel] // Cancer Res. - 2007. - 67(6):2824-9.

Demers M. [et al.] Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. [Artikel] // Am J Pathol. - 2010. - 176(6):3023-31.

Demers M., Magnaldo T. und St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. [Artikel] // Cancer Res. - 2005. - 65(12):5205-10.

Dettin L [et al.] Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. [Artikel] // Biol. Reprod.. - 2003. - 68(1): 51-9.

Drickamer K. Increasing diversity of animal lectin structures [Artikel] // Curr. Opin. Struct. Biol.. - [s.l.] : Elsevier, 1995. - 5(5): 612-6.

Eckart A. [et al.] Korrelation von Galectin-1, PlGF und sFlt-1 im Serum Schwangerer mit und ohne Präeklampsie [Artikel] // Z Geburtshilfe Neonatol. - [s.l.] : Thieme, 2014. - 218-P70.

El-Bahrawy M.A. und Pignatelli M. E-Cadherin and catenins: molecules with versatile role in normal and neoplastic epithelial cell biology. [Journal]. - [s.l.] : Microsc Res Tech, 1998. - Bde. 1; 43(3):22-32.

Ezashi T., Telugu BP. und Roberts RM. Model systems for studying trophoblast differentiation from human pluripotent stem cells. [Journal]. - 2012. - 349(3):809-24. : Bd. Cell Tissue Res. .

Fischer I. [et al.] Is galectin-1 a trigger for trophoblast cell fusion?: the MAP-kinase pathway and syncytium formation in trophoblast tumour cells BeWo. [Journal]. - 2011. - 10.1093/molehr/gar053. Epub 2011 Aug 10 : Bd. Mol Hum Reprod. .

Fischer I. [et al.] Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. [Journal]. - 2010. - 31(9):825-32. doi: 10.1016/j.placenta.2010.06.016. Epub 2010 Jul 24. : Bd. Placenta. .

Freitag N. [et al.] Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. [Journal]. - 2013. - 110(28):11451-6. doi: 10.1073/pnas.1303707110. Epub 2013 Jun 24. : Bd. Proc Natl Acad Sci U S A..

Friese K, Plath Ch. und Briese V. Frühgeburt und Frühgeborenes [Buch]. - Berlin : Springer, 2000.

Fukumori T. [et al.] CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. [Artikel] // Cancer Res.. - 2003. - 63(23): 8302-11.

Gabius HJ Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. [Artikel] // Anat. Histol. Embryol.. - 2001. - 30(1): 3-31.

Gabius HJ und Kaltner H. Animal lectins: from initial description to elaborated structural and functional classification. [Artikel] // Adv. Exp. Med. Biol.. - 2001. - 491: 79-94.

Gabriel A., Rabinovich G.A. und Marta A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. [Artikel] // Nature Reviews Immunology. - 2009. - 9, 338-352.

Gallin W.J., Edelman G.M. und Cunningham B.A. Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. [Artikel] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1983. - 80(4): 1038-42.

Gardner L. und Moffet A. Dendritic cells in the human decidua. [Journal]. - [s.l.] : Biol Reprod, 2003. - 69(4): 1438-1446.

Genbavec O. [et al.] Establishment of human trophoblast progenitor cell lines from the chorion [Artikel] // Stem Cells. - 2011. - 29(9): 1427-36.

Gerbaud P. und Pidoux G. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. [Journal]. - [s.l.] : Placenta, 2015. - 36 Suppl 1:S35-42..

Gerthsen Chr. und Kneser H. O. Physik [Buchabschnitt]. - Heidelberg : Springer Verlag, 10. Auflage, 1969.

Getsios S., Chen GT. und MacCalman CD. Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. [Journal]. - 2000. - 119(1):59-68. : Bd. J Reprod Fertil..

Goldenstein I. [et al.] What should be called lectin? [Artikel] // Nature. - 1980. - 285, 66.

Graham CH. [et al.] Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. [Journal]. - 1993. - 206(2):204-11 : Bd. Exp Cell Res..

Gray C. A. [et al.] Galectin-15 in ovine uteroplacental tissues. [Artikel] // Reproduction. - 2005. - 130(2); 231-240.

Gray C. A., Adelson D. L. und al. et Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in in the trophectoderm. [Artikel] // Proceedings of National Academy of Science. - 2004. - 101(21); 7982-7987.

Gstraunthaler G. und Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen [Buch]. - Heidelberg : Springer Spektrum, 7. Auflage, 2013.

Gupta G.S. Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications [Buch]. - Wien : Springer Verlag, 2012.

Hirabayashi J. und Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. [Artikel] // Glycobiology. - [s.l.] : Oxford Journals, 1993. - 3(4): 297-304.

Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium [Buch]. - Stuttgart : Thieme, 2012.

Hsu D.K. und Liu F.T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. [Artikel] // Glycoconj. J.. - 2004. - 19(7-9): 507-15.

Hsu M.Y. [et al.] E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediates growth control and down-regulates expression of invasion -related adhesion receptors. [Artikel] // Am J Pathol.. - 2000. - 156(5):1515-25.

Hughes RC. Secretion of the galactin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. [Artikel] // Biochim. Biophys. Acta.. - 1999. - 1473(1): 172-85.

Hughes und RC. Galectins as modulators of cell adhesion. [Artikel] // Biochimie. - 2001. - 83(7): 667-76.

Human Embryology [Online]. - Universität Freiburg, Lausanne und Bern; Schweizerischer Virtueller Campus. - 04. 06 2013. - <http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/fecond02.html>.

Hutter S. [et al.] Gal-1 silenced trophoblast tumour cells (BeWo) show decreased syncytium formation and different miRNA production compared to non-target silenced BeWo cells. [Journal]. - [s.l.] : Cell Adh Migr, 2016. - 10(1-2): 28–38.

Hyafil F., Babinet C. und Jacob F. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. [Artikel] // Cell. - 1981. - 26(3 Pt 1): 447-54.

Imhof B.A. [et al.] Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. [Artikel] // Cell. - 1983. - 35(3 Pt 2): 667-75.

Jeschke U. [et al.] Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1. [Journal]. - 2004. - 121(6):501-8. Epub 2004 Jun 8. : Bd. Histochem Cell Biol. .

Jeschke U. [et al.] Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1an anti-TF antibody. [Journal]. - [s.l.] : Histochem Cell Biol, 2006. - 126(4):437-44.

Jeschke U. [et al.] Expression and function of galectins in the endometrium and at the human fetomaternal interface. [Journal]. - [s.l.] : Placenta, 2013. - Bde. 34(10):863-72.

Jeschke U. [et al.] Expression of galectin-1, -3 and the Thomson-Friedenreich antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. [Artikel] // Placenta. - 2007. - 28(11-12):1165-73.

Jeschke U., Toth B. und al. et Glycoprotein and carbohydrate binding protein expression in the placenta in early pregnancy loss. [Artikel] // Journal of Reproductive Immunology. - 2010. - 85(1); 99-105.

Kan NG. [et al.] Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoectoderm. [Artikel] // Development. - 2007. - 134(1):31-41.

Karimi K. und Arck PC. Natural Killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. [Artikel] // Brain Behav Immun. - 2010.

Kasai K. und Hirabayshi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. [Artikel] // J. Biochem.. - 1996. - 119(1): 1-8.

Kiechle M. Gynäkologie und Geburtshilfe [Buch]. - München : Elsevier Verlag, 2007.

Kleinstei J. und Gips H. Die Endokrinologie und Biochemie von Fetus und Plazenta [Buchabschnitt] // Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Schwangerschaft I / Buchverf. Bender H.G., Diedrich K. und Künzel W.. - München : Urban & Fischer Verlag, 2000.

Knerr I. [et al.] Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal disturbed human placentogenesis. [Artikel] // Mol Hum Reprod.. - 2004. - 10(8): 581-8.

Koletzko B. Kinderheilkunde und Jugendmedizin [Buch]. - Heidelberg : Springer, 2004.

Kolundzic N. [et al.] Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery - a functional study in vitro. [Artikel] // PloS one.. - 2011. - 6(12):e28514.

Kopitz J. [et al.] Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. [Artikel] // J. biol. Chem.. - 2001. - 276(38):35917-23.

Kowalczyk AP und Borwardt JE, Grenn, KJ Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. [Artikel] // J. Invest. Dermatol.. - 1996. - 107(3): 293-300.

Ksai K. und Hirabayshi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. [Artikel] // J. Biochem.. - [s.l.] : Oxford Journals, 1996. - 119(1): 1-8.

Kuchler S. [et al.] Immunohistochemical localization of a beta-galactoside-binding lectin in rat central nervous system. II. Light- and electron-microscopical studies in developing cerebellum. [Artikel] // Dev. Neurosci.. - 1989. - 11(6): 414-27.

Künzel W. und Lang U. Stoffaustausch über die Plazenta [Buchabschnitt] // Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Schwangerschaft I / Buchverf. Bender H.G., Diedrich K. und Künzel W.. - München : Urban & Fischer Verlag, 2000.

Lala PK. [et al.] Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. [Journal]. - 2002. - 80(2):142-9. : Bd. Can J Physiol Pharmacol. .

Langbein M. [et al.] Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. [Artikel] // Mol Reprod Dev. - 2008. - 75(1):175-83.

Larue L. [et al.] E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophoectoderm epithelium. [Artikel] // Proc Natl Acad Sci USA.. - 1994. - 91(17):8263.

Leffler H. [et al.] Introduction to galectins. [Artikel] // Glycoconj. J.. - 2004. - 19(7-9): 433-40.

Li X.L. [et al.] Increased expression levels of E-Cadherin, cytokreatin 18 and 19 observed in preeclampsia were not correlates with disease severity. [Journal]. - [s.l.] : Placenta, 2014. - 35(8):625-31.

Lindl Toni und Gstraunthaler Gerhard Zell- und Gewebekultur [Buchabschnitt]. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2008.

Linnemann M. und Kühl M. Biochemie für Mediziner [Buch]. - Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2003. - Bd. 5. Auflage.

Lippert E. [et al.] Galectin-3 vermindert die akute und chronische DSS-Kolitis bei Mäusen. [Journal]. - [s.l.] : Gastroenterol, 2008. - 46 - G12.

Lis H. und Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition [Artikel] // Chem. Rev.. - 1998. - 98(2):637-674.

Lis H. und Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. [Artikel] // Eur. J. Biochem.. - 1993. - 218(1): 1-27.

Liu A. X., Jin F. und al. et Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental tissue of early pregnancy loss. [Artikel] // Biology of Reproduction. - 2006. - 75(3); 414-420.

Liu F.T. und Rabinovich G.A. Galectins as modulators of tumour progression. [Artikel] // Nature Review Cancer. - 2005. - 5(1): 29-41.

Lobsanov Yuri d. [et al.] X-Ray Crystal Structure of the Human Dimeric S-Lac Lectin, L-14 II, in Complex with Lactose at 2.9-Å Resolution [Artikel] // The Journal of Biological Chemistry. - USA : The American Society for Biochemistry and Molecular Chemistry, Inc., 1993. - Vol. 268(36); 27034-27038.

Lottspeich F. und Zorbas H. Bioanalytik [Buchabschnitt]. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1. Auflage, 1998.

Lui FT Regulatory roles of galectins in the immune response. [Journal]. - 2005. - 136(4):385-400 : Bd. Int Arch Allergy Immunol..

Lui FT., Rabinovich, GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. [Journal]. - 2010. - 1183:158-82. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x. : Bd. Ann N Y Acad Sci..

Lüllmann-Rauch Renate Taschenlehrbuch Histologie [Buch]. - Stuttgart : Thieme Verlag KG, 2. Auflage, 2003.

Maeda N. [et al.] Involvement of Galectin-1 and Galectin-3 in Proliferation and Migration of Rat Hepatic Stellate Cells in Culture. [Artikel] // Comp. Hepatol.. - 2004. - 3(1): 10.

Malassiné A. [et al.] Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. [Journal]. - 2005. - 26(7):556-62. : Bd. Placenta..

Margineanu E., Cotrutz E. und Cotrutz C. Correlation between E-Cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis. [Artikel] // Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.. - 2008. - 112(2):432-6.

Markert U.R. [et al.] Die fetomaternale Grenzzone [Buchabschnitt] // Fehlgeburten Totgeburten Frühgeburten: Ursachen, Prävention und Therapie / Buchverf. Toth B.. - Heidelberg : Springer-Verlag, 2017.

Marsich E. [et al.] Galectin-1 in cartilage: expression, influence on chondrocyte and interaction with ECM components. [Artikel] // Matrix Biol.. - 2008. - 27(6):513-25.

Maynard S., Epstein F.H. und Karumanchi S.A. Preeclampsia and angiogenic imbalance. [Journal]. - [s.l.] : Annu Rev Med., 2008. - 59:61-78.

Mello CB. [et al.] Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. [Journal]. - 2015. - 56(2):693-704. doi: 10.1167/iov.14-15100. : Bd. Invest Ophthalmol Vis Sci..

Miller J.R. [et al.] Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. [Artikel] // Oncogene.. - 1999. - 18(55):7860-72.

Moiseeva EP [et al.] Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. [Artikel] // Cardiovasc. Res.. - 2000. - 45(2): 493-502.

Moiseeva EP. und Williams B.: Samani, NJ. Galectin 1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells [Artikel] // Biochim Biophys Acta.. - 2003. - 1619 (2): 125-32.

Molvarec A. et al. Periphal blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia [Artikel] // Clinical Immunology. - 2011.

Moremen KW. Golgi alpha-mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. [Artikel] // Biochim. Biophys. Acta.. - 2002. - 1573(3): 225-35.

Mülhardt Cornel Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics [Buchabschnitt]. - München : ELSEVIER Spektrum, Akademischer Verlag, 5. Auflage, 2006.

Mulisch M. und Welsch U. Mikroskopische Technik [Buch]. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 18. Auflage, 2010.

Mulisch Maria und Welsch Ulrich Romeis Mikroskopische Technik [Buchabschnitt]. - Heidelberg : SPEKTRUM, Akademischer Verlag, 18. Auflage, 2010.

Nakahara S., Oka N. und Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. [Artikel] // Apoptosis. - 2005. - 10(2):267-75.

Neuberger A. und van Deenen L. L. M Glycoproteins II [Buchabschnitt]. - Amsterdam : Elsevier Science B. V., 29. Auflage; 1997.

Newton C. R. und Graham A. PCR [Buchabschnitt]. - Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1. Auflage, 1994.

Noll Sabine und Schaub-Kuhnen Susanne Praxis der Immunhistochemie [Buchabschnitt]. - München : Urban & Fischer Verlag, 1. Auflage, 2000.

Nollet F., Kools P. und van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. [Artikel] // J. Mol. Biol.. - [s.l.] : Elsevier Verlag, 2000. - 299(3): 551-72.

Ohshima K. [et al.] Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. [Artikel] // Clin Exp Immunol. - 2001. - 123(3):481-6.

Ozawa M., Ringwald M. und Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by specific domain in the cytoplasmatic region of the cell adhesion molecule. [Artikel] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1990. - 87(11): 4246-50.

Ozeki Y. [et al.] Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. [Artikel] // Glycobiology. - 1995. - 5(2): 255-61.

Paklic D. [et al.] Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. [Artikel] // J Mol Med. - Berlin : Springer, 2008. - 86 (12): 1395-406.

Pattillo R. [et al.] Human hormone production in vitro [Artikel] // Science. - 1968. - 159: 1467-69.

Poirier F. [et al.] Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. [Artikel] // Development. - 1992. - 115(1): 143-55.

Poser I. [et al.] Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. [Artikel] // J Biol Chem.. - 2001. - 276(27):24661-6.

Pötgens AJ. [et al.] Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. [Artikel] // Hum Reprod Updat. - 2004. - 10(6):487-96.

Protein Data Bank [Online]. - 03. 06 2013. - <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1W6N>.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch [Buch]. - Berlin : de Gruyter, 261. Auflage, 2007.

Rabinovic G.A. [et al.] The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. [Artikel] // Cancer Immunol Immunother.. - 2002. - 50(11):597-603.

Rabinovich G.A. [et al.] Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? [Artikel] // Trends Immunol.. - [s.l.] : Elsevier, 2002. - 26(6): 313-20.

Rabinovich GA. und Rubinstein N., Toscano, MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. [Journal]. - 2002. - 1572(2-3):274-84. : Bd. Biochim Biophys Acta..

Ramhorst RE. [et al.] Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. [Journal]. - 2012. - 22(10):1374-86. doi: 10.1093/glycob/cws104. Epub 2012 Jun 28. : Bd. Glycobiology..

Rath W., Gembruch U. und Schmidt S. Geburtshilfe und Perinatalmedizin [Buch]. - Stuttgart : Thieme Verlag, 2010. - Bd. 2. Auflage.

Rehm Hubert und Letzel Thomas Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics [Buchabschnitt]. - Heidelberg : ELSEVIER Spektrum, Akademischer Verlag, 6. Auflage; 2010.

Reis FM., D'Antona D. und Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. [Journal]. - 2002. - 23(2):230-57. : Bd. Endocr Rev..

Remmele W. und Stegner H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. [Journal]. - [s.l.] : Pathologe, 1987. - 8(3):134-40.

Rink L., Kruse A. und Haase H. Immunologie für Einsteiger [Buch]. - Heidelberg : Springer Verlag, 2015.

Sakaguchi M [et al.] A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. [Artikel] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2006. - 103(18): 7112-7.

Saliminejad K. [et al.] Association of common variations of the E-cadherin with endometriosis. [Artikel] // Gynecol Endocrinol.. - 2015. - 20:1-4.

Sanchez-Cuellar S. [et al.] Reduced expression of galectin-1 and galectin-9 by leucocytes in asthma patients. [Journal]. - 2012. - 170(3):365-74. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04665.x. : Bd. Clin Exp Immunol..

Schmalhofer O., Brabletz S. und Brabletz T. E-Cadherin, beta-catenin and ZEB1 in malignant progression of cancer. [Artikel] // Cancer Metastasis Rev.. - 2009. - 28(11-2):151-66.

Schmidt M., Gembruch U. und Rath W. Geburtshilfe und Perinatalmedizin [Buch]. - Stuttgart : Thieme, 2010.

Schmitz Sabine Der Experimentator: Zellkultur [Buchabschnitt]. - München : ELSEVIER Spektrum, Akademischer Verlag, 1. Auflage, 2007.

Schmitz Sabine Der Experimentator: Zellkultur [Buch]. - München : ELSEVIER Spektrum, Akademischer Verlag, 1. Auflage, 2007.

Schnabel A. [et al.] Elevated systemic galectin-1 levels characterize HELLP syndrome. [Journal]. - [s.l.] : J Reprod Immunol, 2016. - 114:38-43. doi:10.1016/j.jri.2016.02.002.

Schneider H., Husslein P. und M. Schneider Die Geburtshilfe [Buch]. - Wiesbaden : C. H. Beck, 2006.

Schuh R. [et al.] Molecular cloning of the mouse cell adhesion molecule uvomorulin: cDNA contains a B1-related sequence. [Artikel] // Proc. Natl. Acad. USA. - 1986. - 83(5): 1364-8.

Seelenmeyer C. [et al.] Cell surface receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. [Artikel] // J. Cell Biol.. - 2005. - 171(2): 373-81.

Sharon N. und Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. [Artikel] // Glycobiology. - [s.l.] : Oxford Journals, 2004. - 14(11); 53R-62R.

Sharon N. und Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. [Artikel] // Glycobiology. - 2004. - 14(11): 53R-62R.

Soares M.J. und Hunt J.S. Placenta and Throphoblast, Methods and Protocols [Buch]. - Totowa, New Jersey : Humana Press, 2006. - Bd. Vol. I.

Sonnegaard Poulsen M. [et al.] Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. [Artikel] // Nanotoxicology. - Copenhagen, Denmark : University of Copenhagen, Institute of Public Health, Faculty of Health Sciences, 2013.

Stauber M. und Weyerstahl Th. Gynäkologie und Geburtshilfe, Duale Reihe [Buch]. - Stuttgart : Thieme, 2005.

Symons A. und Cooper D.N., Barclay, A.N. Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. [Artikel] // Glycobiology. - [s.l.] : Oxford Journals, 2000. - Bde. 10(6): 559-63.

Takahashi-Yanaga F. und Sasaguri T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. [Artikel] // J Pharmacol sci.. - 2007. - 104(4):293-302.

Teichberg Vivian I. [et al.] A beta-D-Galactoside Protein from Electric Organ Tissue of *Electrophorus electricus* [Artikel] // Proc. Nat. Acad. Sci.. - USA : [s.n.], 1975. - Vol. 72, No. 4.

Tekeichi M. Cadherines in cancer: implications for invasion and metastasis. [Artikel] // Curr. Opin. Cell. Biol.. - 1993. - 5(5): 806-11.

Than NG. [et al.] Placental Protein 13 (PP13) - A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy [Artikel] // Front Immunol.. - 2014. - 5:348.

Tirado-González I. [et al.] Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy [Journal]. - 2013. - 19(1):43-53. doi: 10.1093/molehr/gas043. Epub 2012 Sep 21. : Bd. Mol Hum Reprod.

Tomimatsu T. [et al.] Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and longlasting systemic vascular dysfunction. [Journal]. - [s.l.] : Hypertens Res., 2016. - doi:10.1038/hr.2016.152.

Trundley A. und Moffet A. Human uterine leukocytes and pregnancy. [Journal]. - [s.l.] : Tissue Antigens, 2004. - Bde. 63(1):1-12.

Tsai H.F., Wu, C.S. [et al.] Galectin-3 suppresses mucosal inflammation and reduces disease severity in experimental colitis. [Journal]. - [s.l.] : J Mol Med, 2015. - Bde. pp 1-12.

Tuckerman E. [et al.] Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. [Journal]. - [s.l.] : J Reprod Immunol, 2010. - Bde. 87(1-2):60-6.

Ueda S., Kuwabara I. und Liu F.T. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. [Artikel] // Cancer Res. - 2004. - 64(16):5672-6.

Uhlenbruck G. Lektine, Toxine und Immunotoxine [Artikel] // Naturwissenschaften. - [s.l.] : Springer, 1991; Vol. 68, Issue 12, pp 606-612.

Vargas A. [et al.] Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. [Artikel] // Reprod Sci. - 2011. - 18(11):1085-91.

Vargas A. [et al.] Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts. [Journal]. - 2012. - 30;425(1):1-10 : Bd. Virology.

Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. [Artikel] // Glycobiology. - 1993. - 3(2): 97-130.

Vattai A. und Jeschke U. Bedeutung immunologischer Prozesse im 2./3. Trimenon [Buchabschnitt] // Fehlgeburten Totgeburten Frühgeburten: Ursachen, Prävention und Therapie / Buchverf. Toth B.. - Heidelberg : Springer-Verlag, 2017.

Vicovac L., Jankovic M. und Cuperlovic M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. [Artikel] // Hum Reprod.. - 1998. - 13(3):730-5.

von Wolff M. [et al.] Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. [Artikel] // Mol. Hum. Reprod.. - 2005. - 11(23): 189-94.

Walzel H. [et al.] Immunohistochemical and glycohistochemical localisation of the beta-galactoside-binding S-type in human placenta. [Artikel] // Acta Histochem.. - 1995. - Bde. 97(1):33-42.

Wang F. [et al.] Galectin-1 knockdown improves drug sensitivity of breast cancer by reducing P-glycoprotein expression through inhibiting the Raf-1/AP-1 signaling pathway. [Journal]. - [s.l.] : Oncotarget, 2017. - doi: 10.18632/oncotarget.15341.

Weigelt B. und al. et The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. [Artikel] // J Pathol.. - 2010. - 220(1):45-57.

Weyerstahl T. und Stauber M. Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe [Buch]. - Stuttgart : Thieme Verlag, 4. Auflage, 2013.

Weyerstahl T. und Stauber M. Gynäkologie und Geburtshilfe [Buch]. - Stuttgart : Thieme Verlag, 2013. - Bd. 4. Auflage.

Wheelock M.J. [et al.] Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. [Artikel] // J. Cell. Biochem.. - 1983. - 34(3): 187-202.

Wu M., Liu P. und Cheng L. Galectin-1 reduction and changes in T regulatory cells may play crucial roles in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. [Journal]. - 2015. - 8(2):1973-8. eCollection 2015. : Bd. Int J Clin Exp Pathol..

Xu W. und Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. [Artikel] // J. Cell Sci.. - 2007. - 120(Pt 19): 3337-44.

Yang N. [et al.] Silencing of galectin-1 inhibits retinal neovascularization and ameliorates retinal hypoxia in murin model of oxygen-induced ischemic retinopathy. [Journal]. - [s.l.] : Exp Eye Res., 2017. - 159-15. doi:10.1016/j.exer.2017.02.015.

14 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema *„Der Einfluss von Galektin-1-Silencing durch mRNA-Interferenz auf die Synzytiumbildung der Trophoblasten“* selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.08.2018

Lisa Thammer